

НОВОСТИ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК

NEWS OF BIOMEDICAL SCIENCES

Научно-практический и научно-теоретический журнал

Издается с января 2001 года
Published since January, 2001

Выходит четыре раза в год
Published quartely



2025, Т. 25, № 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., доцент
Институт физиологии НАН Беларуси

Секретарь

Ерофеева Анна-Мария Вадимовна, к.б.н., 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, Dr.Sci.Biol., Professor,
Belarusian State University

Responsible Secretary

Filipovich Tatyana Alexandrovna, Cand. Sc. (Biology),
Associate Professor, Institute of Physiology of the National
Academy of

Sciences of Belarus

Secretary

Yerofeyeva Anna-Maria Vadimovna, Cand. Sc. (Biology)
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 17 379-17-82;
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 17 379-17-82;
E-mail: journal@fizio.bas-net.by

СОДЕРЖАНИЕ/CONTENTS

ФИЗИОЛОГИЯ

Е. Н. САВАНЕВСКАЯ, Д. В. ТАПАЛЬСКИЙ

5

СУММАРНАЯ ЭЛЕКТРИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ МОЗГА ЧЕЛОВЕКА ПРИ ОГРАНИЧЕНИИ ДОСТУПА ЗРИТЕЛЬНЫХ И СЛУХОВЫХ РАЗДРАЖИТЕЛЕЙ

Ю. И. РУДАК, Е. Н. САВАНЕВСКАЯ

12

АФФЕРЕНТНАЯ ИМПУЛЬСАЦИЯ ВОЛОКОН *CHORDA TYMPANI* ПРИ РЕЦЕПЦИИ ОРГАНОЛЕПТИЧЕСКИ СХОЖИХ СТИМУЛОВ

Е. М. ТИТОВА, А. Г. ЧУМАК

20

ВЕГЕТАТИВНАЯ РЕГУЛЯЦИИ РИТМА СЕРДЦА И РАБОТОСПОСОБНОСТЬ СПОРТСМЕНОВ СЛОЖНОКООРДИНАЦИОННЫХ ВИДОВ СПОРТА

PHYSIOLOGY

A. M. SAVANEUSKAYA, D. V. TAPALSKI

TOTAL ELECTRICAL ACTIVITY OF THE HUMAN BRAIN DURING VISUAL AND AUDITORY SENSORY DEPRIVATION

YU. I. RUDAK, A. M. SAVANEUSKAYA

NEURAL RESPONSES IN *CHORDA TYMPANI* FIBERS TO PERCEPTUALLY SIMILAR TASTES

E. M. TITOVA, A. G. CHUMAK

VAGOTONIC REGULATION OF HEART RHYTHM AND ATHLETES' WORK CAPACITY IN COMPLEX COORDINATION SPORTS CONSIDERING THE DOMINANT TYPE OF AUTONOMIC REGULATION

ПАТОФИЗИОЛОГИЯ

Е. Н. ЧЕПЕЛЕВА, Ф. И. ВИСМОНТ

28

ОБ УЧАСТИИ КЛЕТОК КУПФЕРА В ПРОЦЕССАХ ДЕТОКСИКАЦИИ, ФОРМИРОВАНИЯ ТИРЕОИДНОГО СТАТУСА И ДИСЛИПИДЕМИИ У КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ПЕРИТОНИТОМ

PATHOPHYSIOLOGY

E. N. CHEPELEVA, F. I. VISMONT

ON THE PARTICIPATION OF KUPFFER CELLS IN DETOXIFICATION PROCESSES, FORMATION OF THYROID STATUS AND DYSLIPIDEMIA IN RATS WITH EXPERIMENTAL PERITONITIS

МОРФОЛОГИЯ

Е. И. БОНЬ, Н. Е. МАКСИМОВИЧ, О. А. КАРНЮШКО, С. М. ЗИМАТКИН, А. А. НОВАК

42

ИЗМЕНЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ BCL-2 В ТЕМЕННОЙ КОРЕ И ГИППОКАМПЕ КРЫС ПРИ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ

Т. Е. КУЗНЕЦОВА, Ж. А. ГЛАДКОВА

48

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ПОЛОСАТОГО ТЕЛА КРЫС ПОСЛЕ КУРСОВОГО ИНТРАНАЗАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА *ESCHERICHIA COLI*

Н. И. НЕЧИПУРЕНКО, Т. Е. КУЗНЕЦОВА, Е. А. КОРОТКЕВИЧ, И. Д. ПАШКОВСКАЯ, Э. Ш. РАХМОНОВ, Н. А. ТРУШЕЛЬ, Н. А. ЮЗЕФОВИЧ

56

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ СЕДАЛИЩНОГО НЕРВА ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ КОМПРЕССИОННО-ИШЕМИЧЕСКОЙ НЕВРОПАТИИ В УСЛОВИЯХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ТРАНСПЛАНТАТА АМНИОТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ

С. А. НОВАКОВСКАЯ, Е. В. ФЁДОРОВА, А.-М. В. ЕРОФЕЕВА, М. В. СИМОНЧИК, А. А. БАСАЛАЙ

69

ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ МИОКАРДА ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ХРОНИЧЕСКОЙ ИЗОПРОТЕРЕНОЛ-ИНДУЦИРОВАННОЙ ИШЕМИИ СЕРДЦА

С. Н. РЯБЦЕВА, М. А. КОРНЕЕВА, А. О. ЧЕБОТАРЬ, И. А. СЕМЁНИК, А. Ю. ШАЛАБODOVA, Д. И. ГОЛОВАЧ, В. М. КУНЦ

78

MORPHOLOGY

L. I. BON, N. Ye. MAKSIMOVICH, O. A. KARNYUSHKO, S. M. ZIMATKIN, A. A. NOVAK

CHANGES IN BCL-2 CONTENT IN THE PARIETAL CORTEX AND HIPPOCAMPUS OF RATS WITH CEREBRAL ISCHEMIA OF VARYING SEVERITY

T. E. KUZNETSOVA, Z. A. HLADKOVA

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL FEATURES OF THE RAT STRIATUM AFTER LONG-TERM INTRANASAL ADMINISTRATION OF *ESCHERICHIA COLI* LIPOPOLYSACCHARIDE

N. I. NECHIPURENKO, T. E. KUZNECOVA, E. A. KOROTKEVICH, I. D. PASHKOVSKAYA, E. Sh. RAHMONOV, N. A. TRUSHEL, N. A. YZEFOVICH

MORPHOLOGICAL CHANGES IN THE SCIATIC NERVE IN MODELING COMPRESSION-ISCHEMIC NEUROPATHY USING AN AMNIOTIC MEMBRANE TRANSPLANT

S. A. NOVAKOVSKAYA, E. V. FEDOROVA, A.-M. V. YEROFEYEVA, M. V. SIMONCHIK, A. A. BASALAI

FEATURES OF THE STRUCTURAL ORGANIZATION OF THE MYOCARDIUM IN MODELING CHRONIC ISOPROTERENOL-INDUCED CARDIAC ISCHEMIA

S. N. RJABCEVA, M. A. KORNEEVA, A. O. CHABATAR, I. A. SIAMIONIK, A. Yu. SHALABODOVA, D. I. GALAVACH, V. M. KUNZ

**КО-ЭКСПРЕССИЯ КОЛЛАГЕНА 1 И 3 ТИПОВ
СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ ГРЫЖЕВОГО МЕШКА И
КОЖИ В ОБЛАСТИ ГРЫЖЕВОГО ВЫПАЧИВАНИЯ
ПАЦИЕНТОВ РАЗНОГО ПОЛА**

БИОХИМИЯ

*С. В. ВАСИЛЕВИЧ, Е. А. ДЕМИДИК, А. С. ЛЮЛЯ, Е. А.
МАРКОВА, С. В. ФЕДОРОВИЧ*

**ДЕЙСТВИЕ КОРОТКОЦЕПОЧЕЧНЫХ ЖИРНЫХ И
ПИРОВИНОГРАДНОЙ КИСЛОТ НА ОБРАЗОВАНИЕ
АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В ГОМОГЕНАТАХ
МОЗГА И ПЕЧЕНИ КРЫС**

МИКРОБИОЛОГИЯ

Д. В. ТАПАЛЬСКИЙ, М. В. СИМОНЧИК, Е. В. КАРПОВА

**ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ
СЕЛЕКТИВНОЙ ДЕКОНТАМИНАЦИИ КИШЕЧНИКА С
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОДНОКАМЕРНОЙ
ДИНАМИЧЕСКОЙ ПРОТОЧНОЙ СИСТЕМЫ**

БИОМЕДИЦИНСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ

*В. Г. БОГДАН, Е. В. ФЁДОРОВА, Т. А. ФИЛИПОВИЧ,
И. П. ЖАВОРОНОК, А. С. ДОРОНЬКИНА, С. Г. ЛЕПЕШКО,
С. В. МАНЬКОВСКАЯ*

**АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ КЛЕТОЧНОГО
ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА ПРИ ЛОКАЛЬНОМ
ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПЛАЗМИДНОЙ КОНСТРУКЦИИ
VEGF165 / ANG-1 В УСЛОВИЯХ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ
НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ**

*Д. В. ЛУЦКОВИЧ, А.-М. В. ЕРОФЕЕВА, М. А. КОРНЕЕВА,
Е. С. ЛУЦКОВИЧ, С. В. МАНЬКОВСКАЯ, Д. О. ДОРМЕШКИН,
А. Н. МЕЛЕШКО*

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ АНТИ-GD2 CAR-T ТЕРАПИИ
НЕЙРОБЛАСТОМЫ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ
ИССЛЕДОВАНИЕ)**

*П. А. ХМАРСКИЙ, С. А. ГОЛУБЕВА, Е. В. ЛЕМЕШКО,
С. В. ГУБКИН*

**ОБНАРУЖЕНИЕ ФАЗ ШАГА ПАЦИЕНТА ПО ДАННЫМ
ИНЕРЦИАЛЬНОГО ИЗМЕРИТЕЛЬНОГО МОДУЛЯ**

ОБЗОРНЫЕ И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

А. Е. БАРТОШ

**ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ ЛЕПТИНА В НОРМЕ И
ПРИ ОЖИРЕНИИ: ВЛИЯНИЕ НА КОГНИТИВНЫЕ
ФУНКЦИИ**

С. А. КОЛЫХАН, Т. Б. МЕЛИК-КАСУМОВ

**РОЛЬ ИММУННЫХ ПРОЦЕССОВ В РЕАЛИЗАЦИИ
КИШЕЧНО-МОЗГОВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ПРИ
ЭПИЛЕПТОГЕНЕЗЕ**

ОТ РЕДАКЦИИ

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

**CO-EXPRESSION OF COLLAGEN TYPE 1 AND 3 IN
CONNECTIVE TISSUE OF THE HERNIAL SAC AND
SKIN IN THE AREA OF HERNIAL PROCESSING IN
PATIENTS OF DIFFERENT GENDER**

BIOCHEMISTRY

84 *S. V. VASILEVICH, E. A. DEMIDIK, A. S. LYULYA, E. A.
MARKOVA, S. V. FEDOROVICH*

**EFFECT OF SHORT CHAIN FATTY AND PYRUVIC ACID
ON OXIDATIVE STRESS DEVELOPMENT IN RAT
BRAIN AND LIVER HOMOGENATES**

MICROBIOLOGY

91 *D. V. TAPALSKI, M. V. SIMONCHIK, E. V. KARPOVA*

**PHARMACOKINETIC MODELING OF SELECTIVE
DIGESTIVE DECONTAMINATION USING A SINGLE-
CHAMBER DYNAMIC FLOW SYSTEM**

BIOMEDICAL TECHNOLOGY

98 *V. G. BOGDAN, E. V. FIODOROVA, T. A. FILIPOVICH,
I. P. ZHAVORONOK, A. S. DORONKINA, S. G. LEPESHKO,
S. V. MANKOVSKAYA*

**ACTIVITY OF CELLULAR ENERGY METABOLISM
ENZYMES DURING LOCAL USE OF PLASMID
CONSTRUCT VEGF165 / ANG-1 IN EXPERIMENTAL
CHRONIC ISCHEMIA OF LOWER LIMBS**

108 *D. V. LUTSKOVICH, A.-M. V. YEROFEYEV, M. A.
KORNEEVA, K. S. LUTSKOVICH, S. V. MANKOVSKAYA, D. O.
DORMESHKIN, A. N. MELESHKO*

**A SYNGENEIC MOUSE MODEL OF ANTI-GD2 CAR-T
THERAPY FOR NEUROBLASTOMA**

115 *P. A. KHMARSKY, S. A. GOLUBEVA, S. V. GOUBKIN,
Y. V. LEMESHKO*

**PATIENT STEP DETECTION BY DATA OF INERTIAL
MEASUREMENT MODULES**

REVIEW AND PROBLEM ARTICLES

124 *A. E. BARTOSH*

**PHYSIOLOGICAL ROLE OF LEPTIN IN NORMAL
STATES AND IN OBESITY: INFLUENCE ON COGNITIVE
FUNCTIONS**

134 *S. A. KOLYHAN, T. B. MELIK-KASUMOV*

**THE ROLE OF IMMUNE PROCESSES IN THE
REALIZATION OF GUT-BRAIN INTERACTIONS IN
EPILEPTOGENESIS**

EDITORIAL NOTES

143 **INSTRUCTIONS FOR AUTHORS**

Е. Н. САВАНЕВСКАЯ^{1,2}, Д. В. ТАПАЛЬСКИЙ²

СУММАРНАЯ ЭЛЕКТРИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ МОЗГА ЧЕЛОВЕКА ПРИ ОГРАНИЧЕНИИ ДОСТУПА ЗРИТЕЛЬНЫХ И СЛУХОВЫХ РАЗДРАЖИТЕЛЕЙ

¹ *Белорусский государственный университет, г. Минск, Республика Беларусь*

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

В статье рассматривается влияние кратковременной сенсорной депривации на электрическую активность головного мозга человека. Исследование проводилось при участии 30 здоровых молодых людей, у которых регистрировали электроэнцефалограмму (ЭЭГ) во время и после часового ограничения доступа зрительных и слуховых стимулов. Результаты показали, что сенсорная депривация сопровождается заметными изменениями электрической активности мозга, характер которых различается в зависимости от локализации. Наиболее значительные изменения спектрального состава ЭЭГ были зарегистрированы в затылочных областях головы. Здесь мощность ЭЭГ увеличилась в альфа-диапазоне и уменьшилась в дельта- и тета-диапазонах спектра. В теменных и височных областях изменения были менее выраженными, а в лобных – минимальными. После окончания депривации индексы ритмов ЭЭГ практически полностью вернулись к исходным значениям.

Ключевые слова: сенсорная депривация, электроэнцефалография, ЭЭГ, альфа-ритм, спектральный анализ, межполушарная асимметрия.

Введение. Под сенсорной депривацией понимают снижение объема сенсорной информации, поступающей по афферентным путям в центральную нервную систему. Термин следует отличать от понятия перцептивной депривации, которая представляет собой искажение паттернов сенсорной стимуляции, а не уменьшение её интенсивности [1]. Интерес к исследованию физиологических функций в условиях сенсорной депривации обусловлен потребностями профессиональной подготовки космонавтов, военнослужащих, пилотов, моряков, длительно находящихся в условиях среды с ограниченными перцептивными характеристиками [2].

С последствиями сенсорной депривации связывают многие распространенные в этих профессиональных группах нарушения поведенческого и гомеостатического характера. К ним относятся непереносимость замкнутых пространств, снижение времени сенсомоторной реакции, депрессия, бред и галлюцинации [3], интеллектуальные и когнитивные нарушения, снижение показателей кожно-гальванической реакции, увеличение доли медленных волн в спектре электроэнцефалограммы (ЭЭГ) в теменно-затылочной зоне, повышение уровня адреналина и норадреналина, а также кетогенных стероидов в моче, увеличение содержания тиреотропного гормона в плазме крови [4].

В течение десятилетий нейрофизиологические исследования концентрировались на поиске физиологических коррелятов нарушений, наблюдающихся у лиц, демонстрировавших поведенческие изменения при сенсорной депривации.

Наиболее распространенной моделью, используемой в исследованиях сенсорной депривации, является деафферентация зрительной коры у грызунов. Уже в ранних работах Ардуини и Хирао [5] была описана синхронизация ритмики ЭЭГ, наблюдавшаяся у мышей при деафферентации зрительной коры. Авторы выявили характерные изменения возбудимости зрительной коры, наблюдавшихся на фоне десинхронизации ЭЭГ в состоянии покоя. Они проявлялись в форме ритмических синхронных разрядов на фоне высокоамплитудных

медленных волн частотой 6–8 Гц. В серии исследований Касамацу и Адея [6, 7] изучались изменения возбудимости нейронов зрительной коры у кошек. Было установлено, что импульсация доминирующей популяции нейронов зрительной коры (тип I) после деафферентации приближается по характеру к таковой у нейронов типа III, для которых характерна обратная зависимость частоты разрядов от уровня сознания (медленный сон, быстрый сон, пассивное либо активное бодрствование). Эти данные также свидетельствуют о перестройке нейронной активности зрительной коры после деафферентации.

Исследования влияния сенсорной депривации на параметры ЭЭГ человека показали, что обусловленные ею феномены могут возникать как в состоянии пассивного бодрствования, так и в ходе медленной и быстрой фаз сна [8]. В опытах по регистрации ЭЭГ в зрительной коре и латеральном коленчатом теле были отмечены высокоамплитудные всплески, по своей частоте и амплитуде напоминающие ритмику понто-геникуло-окципитальных волн. Под лобными электродами зарегистрировано избирательное изменение мощности быстрых ритмов (альфа и бета) при относительной сохранности медленноволновой активности. В теменных и височных отведениях наблюдалось умеренное снижение дельта-активности и возрастание мощности альфа-ритма [9].

Таким образом, опыт многолетних исследований сенсорной депривации подчеркивает сложный характер ее влияния на электрическую активность мозга и указывает на необходимость дальнейших исследований для понимания ее механизмов.

Цель работы – охарактеризовать региональные особенности ЭЭГ человека при одночасовой зрительной и слуховой сенсорной депривации.

Материалы и методы исследования. Исследование выполнялось при участии 30 испытуемых обоего пола в возрасте от 19 до 21 года. Все испытуемые были правшами. Они отрицали наличие неврологических заболеваний, а также прием препаратов, оказывающих влияние на функции центральной нервной системы.

Для регистрации ЭЭГ использовали 8-канальное отведение ЭЭГ с помощью компьютерного электроэнцефалографа «Нейрон-Спектр-4» производства «Нейрософт», Российская Федерация. Регистрация проводилась в полутемной комнате в полной тишине в положении сидя. Температура воздуха в комнате равнялась примерно 25 °С, влажность составила около 70 %. Смоченные в изотоническом растворе NaCl 0,9 % мостиковые хлорсеребряные электроды накладывались под электродную шапочку на скальп в точках Fp1, Fp2, C3, C4, T3, T4, O1, O2 (8-канальное отведение) в соответствии с международной схемой 10–20. При необходимости проводилась предварительная подготовка кожи (массаж абразивной пастой Everi (Fiab S.p.a., Италия)). Монтаж электродов осуществлялся по принципу монополярного отведения, референтные электроды фиксировали на мочках ушей (точки A1 и A2). Заземляющий электрод располагали на запястье. Испытуемому предлагалось принять удобное неподвижное положение со свободной фиксацией взгляда.

Для получения контрольных значений в этом положении проводилась двухминутная запись ЭЭГ-сигнала. Далее испытуемому надевалась маска на глаза и наушники с резиновыми заглушками для шумоподавления. В таком положении испытуемый пребывал на протяжении 1 часа. На последних минутах сенсорной депривации проводилась двухминутная регистрация энцефалограммы, после чего маску и наушники снимали. Сразу после начала восстановительного периода ЭЭГ регистрировали в течение 2 мин. После регистрации ЭЭГ восстановительного периода эксперимент завершали.

Анализ ЭЭГ проводился с использованием программы «Нейрон-Спектр.NET» (ООО «Нейрософт», РФ). По окончании записи устанавливались масштаб отображения кривых и развертка. Для анализа использовались 10-секундные отрезки записи по каждой из проб, прошедшие ручную и автоматическую обработку с целью устранения артефактов. Для данных отрезков в каждом из отведений программно рассчитывался индекс ритма (относительная спектральная мощность) в частотных диапазонах α (8–14 Гц), $\beta_{\text{нч}}$ (14–20 Гц), Δ (0,5–4 Гц), Θ (4–8 Гц) (в процентах от общей мощности спектра).

Для представления результатов вычислялось среднее арифметическое индекса ритма по выборке. Величину разброса отражали при этом путем расчета ошибки среднего значения. Достоверность различий между двумя выборками проверялась с использованием t-критерия Стьюдента (для нормальных распределений), т.к. во всех случаях распределение значений соответствовало закону Гаусса. Различия признавались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. В ходе исследования были проанализированы изменения спектральных характеристик ЭЭГ, отведенной от различных областей скальпа, при одночасовой сенсорной депривации и в следующем за ней восстановительном периоде (рисунок 1).

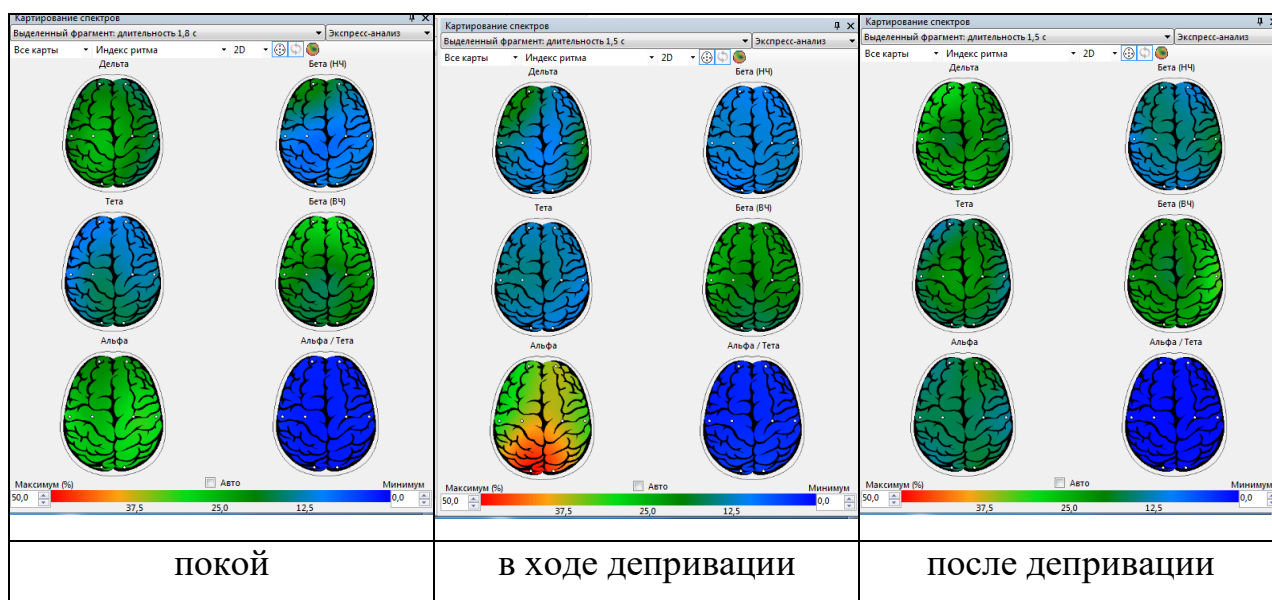


Рисунок 1. Результаты картирования спектров мощности ЭЭГ одного испытуемого в покое, в процессе и после зрительной и слуховой сенсорной депривации

В левом лобном отведении фоновые значения дельта-ритма составили $50,8 \pm 1,9 \%$. Во время депривации при этом статистически значимых различий не наблюдалось: значение индекса ритма в ходе депривации сенсорных систем составило $45,5 \pm 2,3 \%$, а в восстановительном периоде – $46,7 \pm 1,9 \%$ ($p > 0,05$). Динамика тета-ритма ЭЭГ также не являлась статистически значимой. Индекс тета-ритма составил $18,5 \pm 1,1 \%$ в покое, $16,7 \pm 1,4 \%$ во время депривации и $19,2 \pm 1,4 \%$ после нее ($p > 0,05$). Альфа-ритм при депривации характеризовался выраженным ($p < 0,05$) увеличением своей представленности в спектре ЭЭГ в сравнении с исходным уровнем (до $23,5 \pm 2,2 \%$ с $11,6 \pm 0,6 \%$ в покое) и сохранялся на несколько повышенном уровне после ее окончания ($14,2 \pm 0,9 \%$, $p < 0,05$). Бета-ритм значимо снижался относительно фоновых показателей (с $8,8 \pm 1,7 \%$ до $14,0 \pm 1,1 \%$ во время депривации, $p < 0,05$). В период восстановления индекс бета-ритма возвращался на уровень $19,5 \pm 1,4 \%$, который уже значимо не отличался от исходного ($p > 0,05$).

В правом лобном отведении (Fp2-A2) индекс дельта-ритма статистически значимыми изменениями не характеризовался. Его значения составили $46,5 \pm 2,1 \%$ в покое, $44,6 \pm 2,3 \%$ при сенсорной депривации и $47,6 \pm 2,0 \%$ после нее ($p > 0,05$). Относительная мощность ритма ЭЭГ в тета-частотном диапазоне также не подверглась значимым изменениям в ходе депривации. Она характеризовалась значениями $19,0 \pm 1,0 \%$ в покое, $16,8 \pm 1,3 \%$ при депривации и $19,1 \pm 1,2 \%$ в ходе восстановления ($p > 0,05$). Доля альфа-ритма во время депривации достоверно возрастала с $12,6 \pm 0,7 \%$ до $25,1 \pm 2,3 \%$ ($p < 0,05$), а затем снижалась до значений, статистически значимо не отклоняющихся от исходных ($14,1 \pm 0,8 \%$, $p > 0,05$). Бета-ритм демонстрировал достоверное снижение с $21,6 \pm 2,2 \%$ до $12,8 \pm 1,2 \%$ при депривации с последующим восстановлением до $18,9 \pm 1,4 \%$ ($p > 0,05$).

В левом теменном отведении индекс дельта-ритма значимо снижался с $46,5 \pm 2,2 \%$ до $33,9 \pm 2,2 \%$ ($p < 0,05$), а затем восстанавливался до $43,3 \pm 1,9 \%$ ($p > 0,05$). Тета-ритм достоверно не изменялся: его значения в покое составили $23,1 \pm 1,2 \%$, в ходе депривации – $22,0 \pm 1,9 \%$, при восстановлении – $23,3 \pm 1,3 \%$ ($p > 0,05$). Доля альфа-ритма в общей мощности спектра достоверно возрастала при депривации (с $14,1 \pm 0,9 \%$ до $28,3 \pm 2,5 \%$, $p < 0,05$), а затем снижалась до $16,2 \pm 1,4 \%$, что близко к контрольному уровню ($p > 0,05$). В области бета-частот не наблюдалось значительных колебаний относительной мощности. Она составила $15,8 \pm 1,9 \%$ в покое, $14,8 \pm 1,2 \%$ при депривации и $16,8 \pm 1,5 \%$ после ($p > 0,05$).

В отведении С4-А2 дельта-ритм значимо снижался с $47,9 \pm 1,9 \%$ до $32,8 \pm 1,6 \%$ во время депривации ($p < 0,05$), а затем восстанавливался до $46,2 \pm 1,9 \%$ ($p > 0,05$). Тета-ритм изменялся незначительно: с $22,1 \pm 1,2 \%$ до $21,4 \pm 1,5 \%$ и $22,9 \pm 1,2 \%$ ($p > 0,05$). Альфа-ритм существенно возрастал с $14,5 \pm 1,2 \%$ до $30,2 \pm 2,5 \%$ при депривации ($p < 0,05$), а затем снижался до $15,0 \pm 1,2 \%$ ($p > 0,05$). Бета-ритм характеризовался минимальными изменениями – $15,2 \pm 1,3 \%$, $14,7 \pm 1,2 \%$ и $15,7 \pm 1,2 \%$ соответственно ($p > 0,05$).

В левом затылочном отведении отмечались наиболее выраженные изменения: дельта-ритм значимо снижался с $46,5 \pm 1,9 \%$ до $24,4 \pm 2,1 \%$ во время депривации ($p < 0,05$), а затем лишь частично восстанавливался до $43,3 \pm 2,2 \%$ ($p < 0,05$ относительно контроля). Индекс тета-ритма уменьшался с $18,7 \pm 0,9 \%$ до $11,3 \pm 1,2 \%$ при депривации ($p < 0,05$) с последующим возвращением к показателям, близким к фоновым ($16,6 \pm 0,7 \%$, $p > 0,05$). Доля альфа-ритма в спектре ЭЭГ достоверно возрастала с $17,5 \pm 1,2 \%$ в покое до $46,7 \pm 3,7 \%$ при депривации ($p < 0,05$) и сохранялся повышенным на уровне после восстановления ($21,0 \pm 1,3 \%$, $p < 0,05$). Относительная спектральная мощность в бета-частотном диапазоне значимо не отклонялась от показателей фона ни в ходе депривации сенсорной рецепции ($16,9 \pm 1,2 \%$ против $17,0 \pm 1,9 \%$ в покое), ни в период восстановления ($18,8 \pm 1,4 \%$, $p > 0,05$).

В правом затылочном отведении О2-А2 спектральная динамика ЭЭГ была схожей. Показатели дельта-ритма значимо снижались с $48,1 \pm 1,6 \%$ в покое до $23,5 \pm 1,6 \%$ ($p < 0,05$). Затем они возрастали до $43,1 \pm 1,7 \%$, однако это значение было по-прежнему достоверно ниже фонового ($p < 0,05$). Индекс тета-ритма значимо уменьшался с $19,0 \pm 0,8 \%$ до $11,9 \pm 1,1 \%$ ($p < 0,05$). В ходе восстановительного периода он возвращался к исходным значениям ($18,4 \pm 1,2 \%$, $p > 0,05$). Индекс альфа-ритма в ходе депривации характеризовался достоверным ростом значений с $16,1 \pm 1,1 \%$ до $47,6 \pm 3,7 \%$ и сохранялся повышенным (на уровне $20,0 \pm 1,4 \%$) при восстановлении ($p < 0,05$). Индекс бета-ритма не изменялся, составив $16,5 \pm 1,1 \%$ в покое, $16,3 \pm 1,8 \%$ при подавлении рецепторных процессов и $18,1 \pm 1,2 \%$ при восстановлении ($p > 0,05$).

В височных отведениях также отмечались некоторые изменения спектрального состава ЭЭГ. В левом височном отведении Т3-А1 индекс дельта-ритма в ходе депривации сенсорных сигналов значимо снижался с $45,4 \pm 2,3 \%$ до $33,9 \pm 2,5 \%$ ($p < 0,05$), а после нее восстанавливался до $43,3 \pm 2,2 \%$ ($p > 0,05$). Индекс тета-ритма оставался относительно неизменным: $20,3 \pm 1,1 \%$ в покое, $20,1 \pm 1,7 \%$ при депривации и $20,5 \pm 1,1 \%$ после нее ($p > 0,05$). Относительная мощность в альфа-частотном диапазоне существенно возрастала с $14,6 \pm 1,1 \%$ до $27,8 \pm 2,5 \%$ при депривации ($p < 0,05$). В ходе восстановительного периода он вновь снижался до значений, достоверно не отличавшихся от контрольных ($16,1 \pm 1,7 \%$, $p > 0,05$). Индекс бета-ритма не претерпел значимых изменений: $19,3 \pm 2,3 \%$ в фоновом режиме, $17,4 \pm 1,8 \%$ при депривации и $19,6 \pm 1,9 \%$ после нее ($p > 0,05$).

В правом височном отведении уровень относительной мощности в дельта-диапазоне снижался с $47,4 \pm 2,4 \%$ до $35,9 \pm 1,9 \%$ ($p < 0,05$). После окончания депривации он восстанавливался до фонового уровня, его значение составило $43,4 \pm 2,1 \%$ ($p > 0,05$). Вклад тета-ритма в общую мощность спектра сохранялся без значимых изменений ($17,9 \pm 1,1 \%$ в ЭЭГ фона, $17,6 \pm 1,3 \%$ в ходе и $21,1 \pm 1,7 \%$ после сенсорной депривации, $p > 0,05$). Индекс альфа-ритма достоверно возрастал с $13,6 \pm 1,3 \%$ до $27,7 \pm 2,6 \%$ ($p < 0,05$), а после депривации

снижался до $14,1 \pm 1,3 \%$ ($p > 0,05$). Бета-ритм демонстрировал незначительные изменения: $20,7 \pm 2,4 \%$ в покое, $18,0 \pm 1,8 \%$ в ходе и $21,0 \pm 1,8 \%$ после сенсорной депривации ($p > 0,05$).

Таким образом, сенсорная депривация сопровождалась наиболее выраженными изменениями в затылочных областях. Там наблюдалось резкое снижение дельта- и тета-активности на фоне значительного усиления альфа-ритма. В теменных и височных областях изменения спектра ЭЭГ были менее выражены, а в лобных – практически отсутствовали. После прекращения депривации большинство показателей демонстрировало тенденцию к восстановлению исходных значений.

Проведенное исследование позволило выявить динамику спектральных характеристик ЭЭГ, которая не только находит частичное подтверждение, но и отчасти опровергается данными, полученными в более ранних исследованиях. Сравнительный анализ полученных нами результатов с выводами, сформулированными на основе аналогичных исследований, показал, что, хотя основные изменения параметров ЭЭГ при сенсорной депривации в основном воспроизводятся в других исследованиях [10, 11, 12, 13, 14], конкретные проявления динамики ЭЭГ существенно обусловлены использованием различных модификаций методики регистрации, а также выбором параметров депривационного воздействия.

Наиболее заметным эффектом, сопровождающим сенсорную депривацию, стало доминирование альфа-ритма, проявившееся в ответ на сенсорную депривацию. В нашем исследовании было зарегистрировано значимое увеличение индекса альфа-ритма в затылочных отведениях. Это полностью согласуется с результатами Borojerdj V. et al. [10], свидетельствующих о постепенном замедлении ритмов активного бодрствования и доминировании альфа-частот как об основном маркере сенсорной депривации.

Наиболее выраженные изменения ритмики ЭЭГ при сенсорной депривации наблюдались нами в затылочных отведениях, где отмечалось значимое усиление альфа-ритмики ЭЭГ. Интересно отметить, что в нашем исследовании оно сопровождалось статистически значимым снижением дельта-активности в теменных отведениях, тогда как авторами [11, 12, 13, 14] не описано подавление медленноволновой активности. Это расхождение в результатах может объясняться различиями в методике эксперимента. В нашем исследовании использовалась комбинированная зрительно-слуховая депривация, тогда как авторами [10, 11, 12, 13] анализировались эффекты частичной сенсорной изоляции. Внимания также заслуживает разница в скорости восстановления. Siniatchkin M. et al. [13] отмечает длительное сохранение изменений (до недели), в то время как полученные нами результаты свидетельствуют о более быстром восстановлении исходных паттернов ЭЭГ. Это может быть связано с меньшей продолжительностью депривации в нашем эксперименте.

Пространственное распределение наблюдавшихся нами изменений ритма ЭЭГ в ходе сенсорной депривации демонстрируют сходство с таковыми, наблюдавшимися в других исследованиях [10, 11, 12, 13, 14]. В проведенных нами экспериментах перераспределение мощности между основными частотными диапазонами спектра ЭЭГ были выявлены в затылочных отведениях, что соответствует обозначенной [11, 12, 13, 14] особой роли нейронных ансамблей затылочной коры в отреагировании депривационного воздействия. Однако обнаруженная нами выраженная левополушарная асимметрия ответа (разница до 15 % между полушариями) не находит прямого отражения в исследованиях [10, 11, 12, 13], где акцент делается на билатеральность изменений. Описанное разночтение может быть связано с различиями в методике анализа, поскольку наш подход связан с детальным частотным картированием спектральной мощности в 8 отведениях ЭЭГ, в то время как в экспериментах [10, 11, 12, 13] применялся более общий способ анализа ЭЭГ-сигнала. Кроме того, все наши испытуемые были правшами, в то время как сведения о характере моторной асимметрии больших полушарий среди испытуемых в других исследованиях нам недоступны.

Заключение. Таким образом, в ходе исследований было охарактеризовано влияние одночасовой сенсорной депривации на спектральные характеристики ЭЭГ, демонстрирующее выраженную региональную специфику. Наиболее выраженные изменения

спектрального состава ЭЭГ наблюдались в затылочных отведениях, где отмечалось возрастание индекса альфа-ритма одновременно с существенным снижением индексов дельта- и тета-ритмов. Эти изменения частично сохранялись в восстановительном периоде. Лобные отделы продемонстрировали незначительную реакцию, проявлявшуюся в значимом снижении бета-активности при относительной неизменности мощности более медленных волн. Кроме того, были выявлены особенности ответа, не отмечавшиеся в более ранних исследованиях (левополушарная асимметрия ответа в затылочных отведениях).

Полученные данные подтверждают концепцию о «затылочном доминировании» в реакции мозга на депривационный стресс.

Литература:

- [1]. *Krishnan K.R., Glass C.A., Turner S.M. et al.* Perceptual deprivation in the acute phase of spinal injury rehabilitation // *J. Am. Paraplegia Soc.* 1992. Vol. 15, № 2. P. 60–65.
- [2]. *Richards J.S., Hirt M., Melamed L.* Spinal cord injury: a sensory restriction perspective // *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 1982. Vol. 63. P. 195–199.
- [3]. *Slade P.D.* Sensory deprivation and clinical psychiatry // *Br. J. Hosp. Med.* 1984. Vol. 31. P. 256–260.
- [4]. *Goodman A.L.* Neurophysiological and psychopharmacological approaches to sensory deprivation phenomena // *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 1982. Vol. 6. P. 95–110.
- [5]. *Arduini A., Hirao T.* On the mechanisms of the EEG sleep patterns elicited by acute visual deafferentation // *Arch. Ital. Biol.* 1959. Vol. 97. P. 140–155.
- [6]. *Kasamatsu T., Adey W.R.* Excitability changes in various types of visual cortical units in freely behaving cats // *Physiol. Behav.* 1974. Vol. 13. P. 101–112.
- [7]. *Kasamatsu T., Adey W.R.* Immediate effects of total visual deafferentation on single unit activity in the visual cortex of freely behaving cats. I. Tonic excitability changes // *Exp. Brain Res.* 1974. Vol. 20. P. 157–170.
- [8]. *Ziskind E., Augsburg T.* Hallucinations in sensory deprivation – method or madness // *Science.* 1962. Vol. 137. P. 992–993.
- [9]. *Kasamatsu T., Adey W.R.* Immediate effects of total visual deafferentation on single unit activity in the visual cortex of freely behaving cats. II. Rhythmic EEG bursts and PGO waves // *Exp. Brain Res.* 1974. Vol. 20, № 2. P. 171–179.
- [10]. *Boroojerdi B., Battaglia F., Muellbacher W. et al.* Mechanisms underlying rapid experience-dependent plasticity in the human visual cortex // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. Vol. 98. P. 14698–14701.
- [11]. *Gothe J., Brandt S.A., Irlbacher K. et al.* Changes in visual cortex excitability in blind subjects as demonstrated by transcranial magnetic stimulation // *Brain.* 2002. Vol. 125. P. 479–490.
- [12]. *He H.Y., Hodos W., Quinlan E.M.* Visual deprivation reactivates rapid ocular dominance plasticity in adult visual cortex // *J. Neurosci.* 2006. Vol. 26. P. 2951–2955.
- [13]. *Siniatchkin M., Moeller F., Shepherd A. et al.* Altered cortical visual processing in individuals with a spreading photoparoxysmal EEG response // *Eur. J. Neurosci.* 2007. Vol. 26. P. 529–536.
- [14]. *Toosy A.T., Werring D.J., Plant G.T. et al.* Asymmetrical activation of human visual cortex demonstrated by functional MRI with monocular stimulation // *Neuroimage.* 2001. Vol. 14. P. 632–641.

A. M. SAVANEUSKAYA^{1,2}, D. V. TAPALSKI²

TOTAL ELECTRICAL ACTIVITY OF THE HUMAN BRAIN DURING VISUAL AND AUDITORY SENSORY DEPRIVATION

¹ *Belarusian State 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

The article examines the effects of short-term sensory deprivation on the electrical activity of the human brain. The study involved 30 healthy young adults, whose electroencephalograms (EEG) were recorded during and after one hour of restricted visual and auditory stimulation. The results demonstrated that sensory deprivation is accompanied by significant changes in brain electrical activity, with patterns varying depending on cortical localization. The most pronounced spectral EEG changes were observed in the occipital scalp regions, where EEG power increased in the alpha band and decreased in the delta and theta frequency ranges. Less prominent changes were detected in parietal and temporal regions, while frontal areas showed minimal alterations. Following the deprivation period, EEG rhythm indices nearly fully returned to baseline values.

Keywords: sensory deprivation, electroencephalography, EEG, alpha rhythm, spectral analysis, interhemispheric asymmetry.

Ю. И. РУДАК, Е. Н. САВАНЕВСКАЯ

АФФЕРЕНТНАЯ ИМПУЛЬСАЦИЯ ВОЛОКОН *CHORDA TYMPANI* ПРИ РЕЦЕПЦИИ ОРГАНОЛЕПТИЧЕСКИ СХОЖИХ СТИМУЛОВ

Белорусский государственный университет, г. Минск, Республика Беларусь

В исследовании охарактеризованы параметры афферентной импульсации барабанной струны (*Chorda tympani*) крысы при стимуляции языка органолептически схожими раздражителями со вкусом апельсина. Установлено, что предъявление апельсинового сока сопровождалось наиболее выраженным изменением частоты импульсации.

Ключевые слова: вкусовая чувствительность, барабанная струна, афферентная импульсация, крыса, апельсиновый вкус.

Введение. Одной из нерешенных проблем, находящихся в фокусе внимания исследователей вкусовой чувствительности, является отсутствие объективных методов качественной и количественной оценки вкуса. На сегодняшний день не разработаны универсальные методики оценки вкусовых качеств пищи [1]. Большинство существующих методов тестирования вкусовых свойств пищи являются органолептическими, то есть основывающимися на субъективном мнении дегустатора [2, 3, 4].

Согласно современным представлениям о механизме формирования вкусового ощущения, химические соединения, являющиеся вкусовыми стимулами, детектируются клетками вкусовых почек, расположенных в сосочках языка [5]. Генерируемые этими клетками электрические сигналы по волокнам лицевого, языкоглоточного и блуждающего нервов поступают в ядро одиночного пути, в ядра среднего мозга, а затем в таламус. Таламус ретранслирует вкусовую информацию в кору головного мозга, преимущественно в переднюю островковую долю [6]. Таким образом, формированию вкусового ощущения предшествует последовательность электрохимических процессов, которые можно зарегистрировать в эксперименте и оценить количественно.

Кодирование вкусовой информации предполагает различение пяти основных вкусовых модальностей: сладкое, солёное, кислое, горькое и умами (в последнее время выдвигаются предложения о выделении жирового вкуса в качестве отдельной модальности) [7, 8]. Каждая сенсорная клетка языка способна распознавать сразу несколько вкусов благодаря наличию пяти типов мембранных рецепторов к соответствующим химическим агентам (глюкозе, хлориду натрия, ионам водорода, глутамату и др.). Комбинации внутриклеточных сигналов от пяти основных типов вкусочувствительных мембранных сенсоров реализуется в вариативный характер нервной сигнализации вкусовых афферентных волокон, что приводит к формированию широкой палитры вкусовых ощущений [9].

Несмотря на то, что дифференциальная активация вкусовых чувствительных нервных волокон лежит в основе механизма различения основных модальностей вкуса, не выясненным остаётся вопрос, позволяет ли этот механизм различать между собой вкус нескольких раздражителей одной модальности, органолептически воспринимающиеся как похожие.

Цель работы – охарактеризовать параметры импульсации афферентных волокон барабанной струны крысы при стимуляции языка органолептически схожими вкусами.

Материалы и методы исследования. Эксперименты выполнены на 10 белых лабораторных крысах мужского пола массой 250–420 г с учетом положений Европейской конвенции об обращении с лабораторными животными [10] и Модельным законом Межпарламентской Ассамблеи государств – участников СНГ «Об ответственном обращении с животными (новая редакция)» [11, 12, 13].

В качестве анестезии применяли внутрибрюшинное введение уретана (1 г/кг) в разведении 1 мг/мл. До начала эксперимента крысы не получали пищу минимум в течение 12 часов до начала исследования.

Афферентную активность регистрировали в периферическом отрезке барабанной струны животного. Доступ к *Chorda tympani* осуществлялся путем разволокнения жевательной и двубрюшной мышц в месте его присоединения к лингвальной ветви тройничного нерва. Нерв перерезался и брался на лигатуру с сохранением основного ствола интактным. Нерв под вазелиновым маслом помещали на биполярные хлорсеребряные электроды. Электрод подключался ко входу усилителя аппаратно-программного комплекса «Нейрон-Спектр 4» (ООО «Нейрософт», РФ). С помощью программного обеспечения комплекса осуществлялась регистрация поступающего сигнала.

В качестве действующего стимула на дорсальную поверхность языка подавались следующие раздражители: 1) апельсиновый сок в объеме 0,1 мл на ватном тампоне; 2) леденец со вкусом апельсина ($m = 0,1$ г); 3) жевательная конфета со вкусом апельсина ($m = 0,1$ г); 4) печенье со вкусом апельсина ($m = 0,1$ г). В случае с апельсиновым соком при проведении контрольной записи на язык помещался смоченный питьевой водой ватный тампон, в случае с сыпучими раздражителями – сухой ватный валик идентичной массы.

Регистрация афферентной активности проводилась в течение 1 ч после начала воздействия. Длительность контрольной записи также составляла 1 ч. Анализировались максимальная, минимальная, средняя амплитуды, а также частота фазического и тонического компонентов ответа. Кроме того, указанные параметры оценивались для периода послееffects (5 секунд после окончания тонического компонента).

Для представления результатов вычислялось среднее арифметическое по выборке. Величину разброса отражали при этом путем расчета ошибки среднего значения. Достоверность различий между двумя выборками проверялась с использованием t-критерия Стьюдента (для нормальных распределений), т.к. во всех случаях распределение значений было близким к нормальному. Различия признавались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. В ходе экспериментов нами была проведена регистрация афферентной импульсации барабанной струны в ходе стимуляции языка апельсиновым соком, печеньем с апельсиновым вкусом, леденцом и жевательной конфетой с апельсиновым вкусом.

На рисунке 1 представлена кривая, отражающая электрическую активность афферентных нервных волокон *Chorda tympani*, зарегистрированную при стимуляции вкусовых рецепторов языка крысы соком апельсина (контроль – вода).

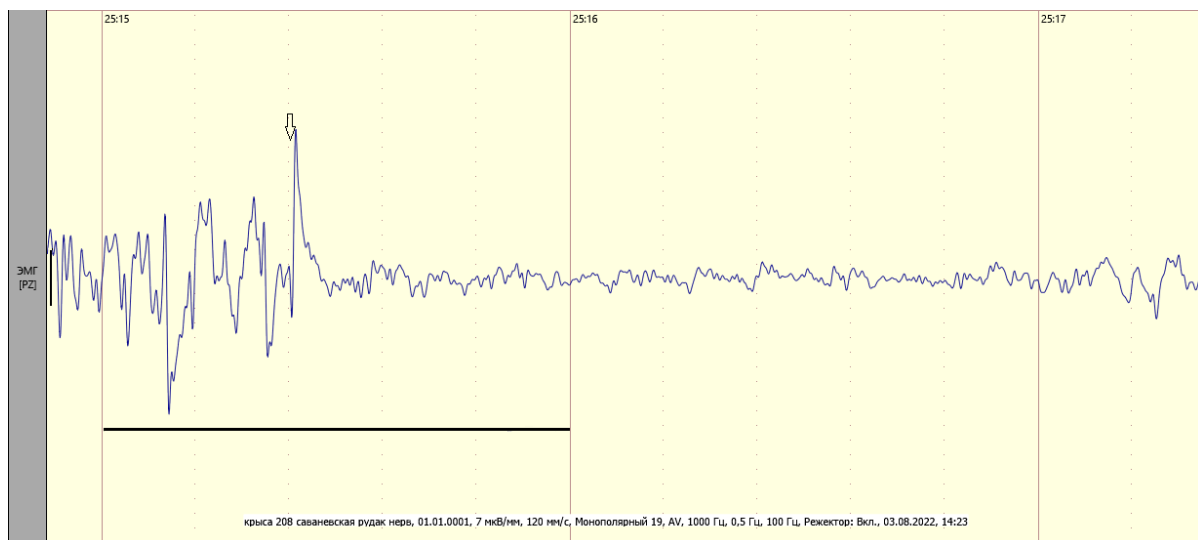


Рисунок 1. Электрическая активность афферентных нервных волокон *Chorda tympani* при стимуляции вкусовых рецепторов языка крысы соком апельсина ($V = 0,1$ мл). Стрелкой обозначен момент нанесения раздражителя на язык. Калибровочные линии: по амплитуде – 28 мкВ, по времени – 1 с

Как видно на рисунке, ответная реакция на вкусовую стимуляцию включает в себя фазический и тонический компоненты. Длительность фазического компонента ответа составила около $8,0 \pm 1,6$ мс. Амплитуда фазической части ответа при стимуляции соком была многократно выше таковой в покое ($33,2 \pm 2,5$ мкВ) и составила $178,1 \pm 9,1$ мкВ ($p < 0,05$).

Длительность тонического компонента ответа при стимуляции языка апельсиновым соком составила в среднем $160,1 \pm 10,4$ мс. Максимальная амплитуда пиков в эту фазу составила $4,7 \pm 1,3$ мкВ, что значительно ниже, чем значение до воздействия ($33,2 \pm 2,5$ мкВ; $p < 0,05$). Минимальная амплитуда пиков практически не отличалась от нуля (фоновое значение – $4,4 \pm 0,7$ мкВ). Средняя частота импульсации достигала $73,5 \pm 5,8$ имп/с, в то время как ее фоновые значения составили $58,8 \pm 1,2$ имп/с ($p < 0,05$).

Анализ периода последствия показал, что показатели афферентной импульсации барабанной струны после вкусовой стимуляции возвращаются к исходному уровню менее, чем через 5 с после воздействия. Максимальная амплитуда пиков в этот период равнялась $32,3 \pm 3,4$ мкВ, минимальная амплитуда – $4,3 \pm 1,3$ мкВ, средняя амплитуда – $15,5 \pm 2,2$ мкВ, частота потенциалов – $60,2 \pm 1,7$ имп/с. Ни один из указанных показателей достоверно не отличался по величине от контрольных значений, что свидетельствует в пользу возвращения характера импульсации к исходному уровню.

На рисунке 2 изображены результаты электронейрографического исследования афферентной активности нервных волокон барабанной струны при предъявлении на язык конфеты-леденца с апельсиновым вкусом.

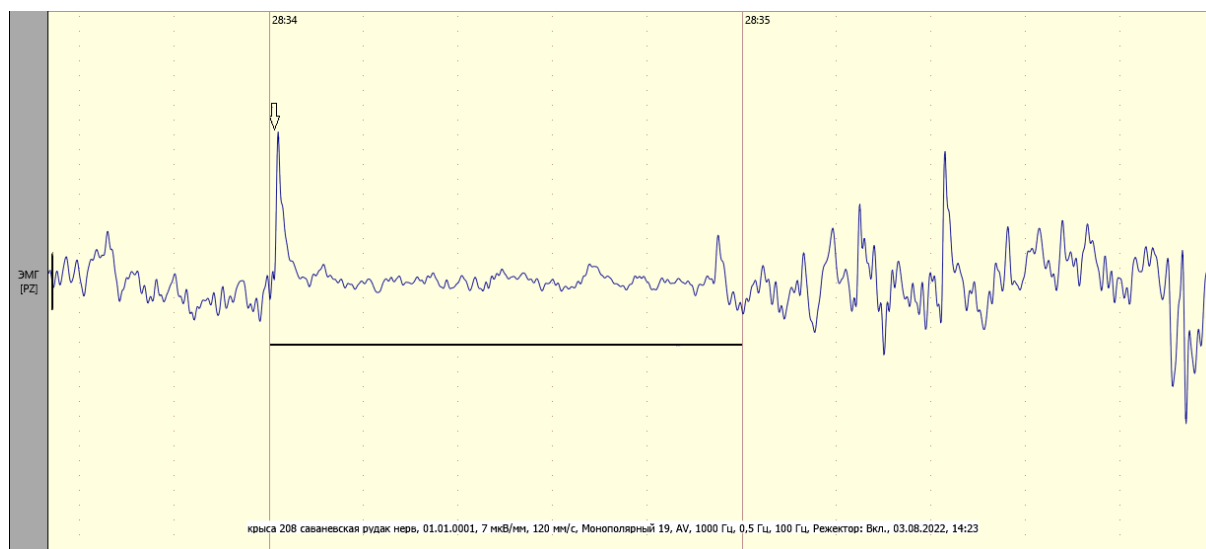


Рисунок 2. Электрическая активность афферентных нервных волокон *Chorda tympani* при стимуляции вкусовых рецепторов языка крысы конфетой-леденцом со вкусом апельсина ($m = 0,1$ г). Стрелкой обозначен момент нанесения раздражителя на язык. Калибровочные линии: по амплитуде – 28 мкВ, по времени – 1 с

Характер фазического компонента реакции слабо отличался от такового, наблюдавшегося при предъявлении апельсинового сока. Ее длительность, как и в предыдущем случае, составила $8,0 \pm 1,5$ мс. Максимальная амплитуда пика равнялась в среднем $180,4 \pm 11,3$ мкВ, что значительно отклонялось от показателей фона ($36,7 \pm 3,1$ мкВ).

Обращает на себя внимание, что длительность тонической фазы реакции была почти вдвое меньше таковой, наблюдавшейся при стимуляции языка апельсиновым соком. Ее значение составило около 0,9 с. При анализе максимальной ($5,9 \pm 2,1$ мкВ), минимальной ($0,2 \pm 0,3$ мкВ) и средней ($2,6 \pm 1,0$ мкВ) амплитуд было выявлено статистически значимое снижение их значений по сравнению с показателями фона ($36,7 \pm 3,1$ мкВ, $5,3 \pm 1,3$ мкВ и $60,6 \pm 1,1$ мкВ соответственно). Средняя частота афферентной импульсации была

статистически значимо выше фоновых значений и составила $68,3 \pm 2,9$ имп/с против $60,6 \pm 1,1$ имп/с до воздействия ($p < 0,05$).

Период последствия по некоторым показателем статистически значимо отличался от значений фона. Так, достоверно ниже величин покоя оказались показатели максимальной амплитуды сигнала ($29,9 \pm 3,8$ мкВ против $36,7 \pm 3,1$ мкВ до воздействия), также почти вдвое упала минимальная амплитуда сигнала ($2,7 \pm 0,4$ мкВ против $5,3 \pm 1,3$ мкВ; $p < 0,05$). Значения средней амплитуды не отличались от фоновых ($15,1 \pm 1,1$ мкВ против $15,0 \pm 1,7$ мкВ). Частота афферентной импульсации ($57,0 \pm 1,2$ имп/с) также примерно равнялась значениям до воздействия ($60,6 \pm 1,1$ имп/с).

На рисунке 3 представлена кривая импульсации нервных волокон барабанной струны крысы, полученная в ходе стимуляции языка жевательной конфетой с апельсиновым вкусом.

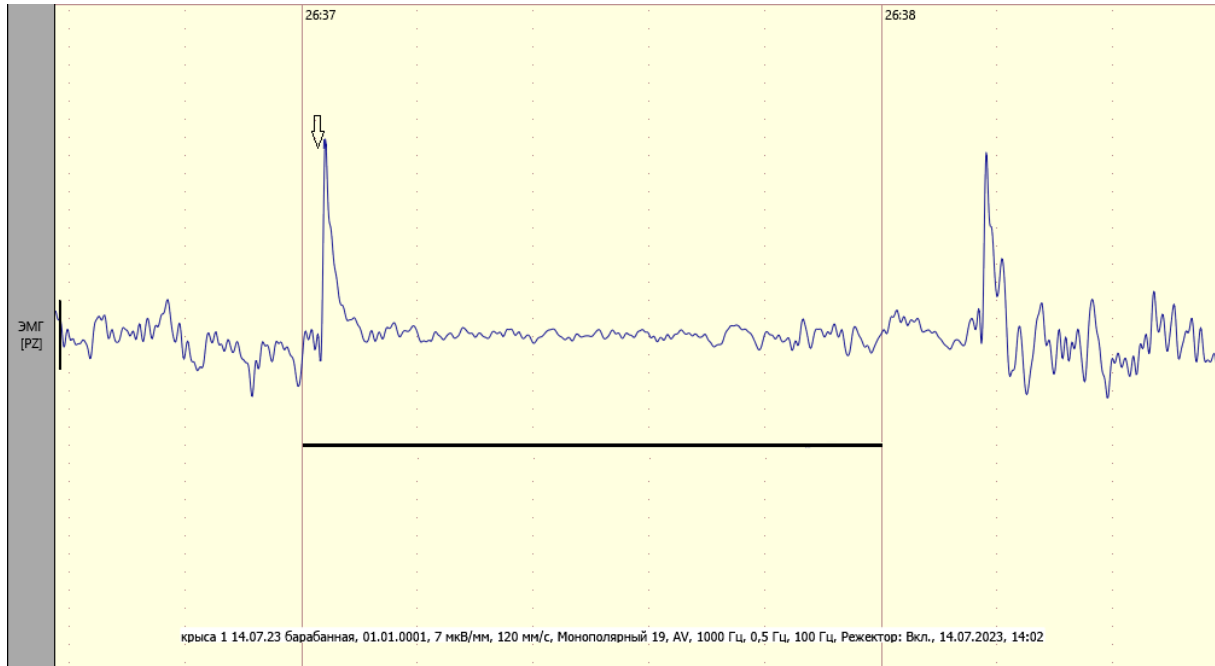


Рисунок 3. Электрическая активность афферентных нервных волокон *Chorda tympani* при стимуляции вкусовых рецепторов языка крысы жевательной конфетой со вкусом апельсина ($m = 0,1$ г). Стрелкой обозначен момент нанесения раздражителя на язык. Калибровочные линии: по амплитуде – 28 мкВ, по времени – 1 с

Максимальная амплитуда фазической части ответа была несколько ниже таковой, наблюдавшейся при предъявлении двух предыдущих раздражителей. Она составила $148,3 \pm 7,5$ мкВ против $178,1 \pm 9,1$ мкВ при стимуляции соком и $180,4 \pm 11,3$ мкВ при предъявлении леденца при длительности фазы длилась $7,0 \pm 0,9$ мс.

Тонический компонент ответа по длительности не превышал 0,6 с. Как минимальная, так и максимальная амплитуды данной фазы реакции были многократно ниже контрольных значений. В численном выражении максимальная амплитуда тонического компонента составила $2,52 \pm 1,7$ мкВ против $23,0 \pm 3,8$ мкВ в покое ($p < 0,05$). Значения минимальной амплитуды равнялись $0,4 \pm 0,1$ мкВ в тоническую фазу против $4,2 \pm 0,6$ мкВ в покое ($p < 0,05$). Средняя амплитуда сигнала составила $1,3 \pm 0,4$ мкВ против $11,8 \pm 1,8$ мкВ в контроле ($p < 0,05$). Частота сигнала по сравнению со значениями до воздействия стала выше ($70,1 \pm 1,4$ имп/с против $63,4 \pm 0,8$ имп/с, $p < 0,05$).

В течение первых 5 секунд, следовавших сразу за тонической фазой ответа, нами не наблюдалось полное восстановление некоторых показателей импульсации барабанной струны. Так, максимальная амплитуда превышала контрольные значения и составила $32,9 \pm 2,5$ мкВ против $23,0 \pm 3,8$ мкВ до воздействия ($p < 0,05$). Частота же, напротив,

снизилась и составила $58,2 \pm 1$ имп/с против $63,4 \pm 0,8$ имп/с ($p < 0,05$). Значения минимальной и средней амплитуд достоверно не отличались от значений покоя ($3,8 \pm 0,5$ мкВ против $4,2 \pm 0,6$ мкВ и $14,9 \pm 1,3$ мкВ против $11,8 \pm 1,8$ мкВ соответственно).

Кроме этого, был определен характер импульсации афферентных волокон барабанной струны крысы после помещения на язык печенья со вкусом апельсина (рисунок 4). Максимальная амплитуда фазового пика составила $123,3 \pm 6,3$ мкВ. Длительность компонента была существенно ниже, нежели при стимуляции другими использованными раздражителями составила около $2,0 \pm 0,4$ мс.

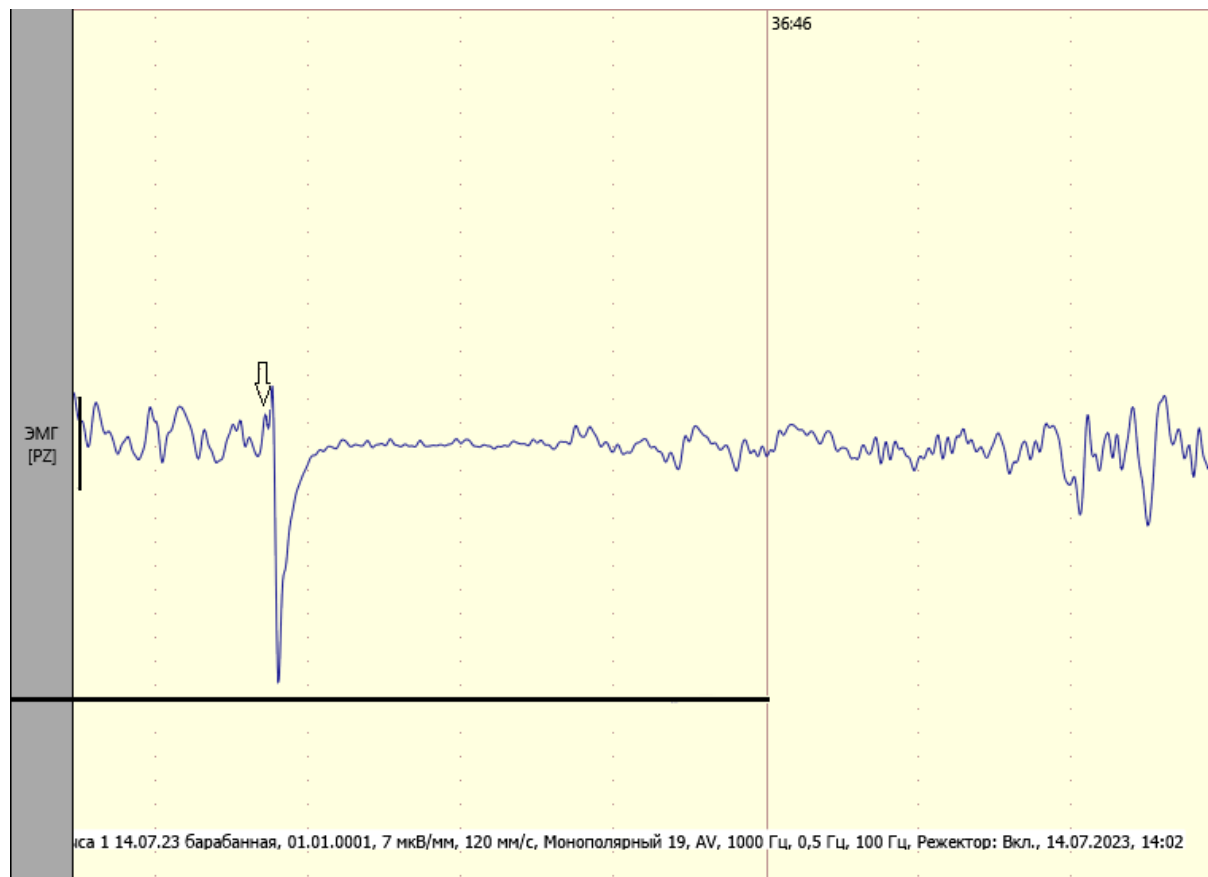


Рисунок 4. Электрическая активность афферентных нервных волокон *Chorda tympani* при стимуляции вкусовых рецепторов языка крысы печеньем со вкусом апельсина. Стрелкой обозначен момент нанесения раздражителя на язык. Калибровочные линии: по амплитуде – 28 мкВ, по времени – 1 с

Тоническая часть ответа по длительности была примерно равна таковой, наблюдавшимся при действии остальных предъявленных стимулов, и равнялась $0,6 \pm 0,4$ с. Максимальная и минимальная амплитуды тонического компонента, как и во всех предыдущих случаях, были значимо ниже таковых в контроле. Усредненное значение максимальной амплитуды равнялось $17,2 \pm 1,8$ мкВ против $34,4 \pm 3,2$ мкВ в контроле ($p < 0,05$), минимальная амплитуда в среднем составила $1,3 \pm 0,5$ мкВ против $5,4 \pm 0,9$ мкВ до воздействия ($p < 0,05$). Средняя амплитуда пиков также статистически достоверно отклонялась в меньшую сторону от значений, наблюдавшихся до воздействия ($6,3 \pm 0,7$ мкВ в сравнении с $17,2 \pm 1,6$ мкВ в покое, $p < 0,05$). Частота импульсации достоверно не отличалась от таковой в контроле ($70,2 \pm 7,7$ имп/с против $64,2 \pm 1,4$ имп/с; $p > 0,05$).

Показатели импульсной активности нервных волокон в течение первых пяти секунд после воздействия характеризовались полным возвращением к фоновому уровню. Значения максимальной ($39,0 \pm 3,7$ мкВ), минимальной ($6,6 \pm 0,4$ мкВ) и средней амплитуд ($17,7 \pm 1,2$ мкВ) значимо не отличались от таковых в покое ($34,4 \pm 3,2$ мкВ, $5,4 \pm 0,9$ мкВ и

17,2 ± 1,6 мкВ соответственно). Частота афферентных импульсов также значимо не превысила фоновые значения (65,6 ± 1,3 имп/с против 64,2 ± 1,4 имп/с до воздействия).

Ряд исследований в последние годы подтвердили, что временные характеристики ответа на вкусовую стимуляцию содержат информацию о характеристиках предъявляемого раздражителя. К примеру, информацию, кодируемую временными характеристиками серии потенциалов, обнаружили в сигналах, генерируемых нейронами ствола мозга [14, 15], а также вкусовой коры [16]. Основная часть вкусовой информации поступает по волокнам барабанной струны – ветви лицевого нерва, иннервирующей вкусовые почки передних двух третей языка [17, 18]. Ввиду этого *Chorda tympani* уже несколько десятилетий служит модельной системой для изучения механизмов кодирования вкуса [19].

Несмотря на большое разнообразие вкусовых раздражителей, их можно разделить на несколько типов в зависимости от принадлежности их к так называемой вкусовой модальности (сладкий, кислый, солёный, горький, умами) [19]. Стимулы, относящиеся к одной вкусовой модальности, в органолептических тестах воспринимаются как очень похожие и часто по ощущениям не отличимы друг от друга. В качестве объективного критерия, позволяющего различить подобные вкусы, в модельных объектах можно рассматривать характер амплитудно-частотных характеристик импульсации хемочувствительных нервных волокон, осуществляющих временное кодирование вкусовой информации. Однако пока не установлено, до какой степени с помощью анализа параметров импульсации хемочувствительных афферентов можно дифференцировать стимулы одной модальности, вызывающие схожие вкусовые ощущения.

В литературе нами было обнаружено описание лишь нескольких исследований, посвященных определению параметров импульсации хемочувствительных афферентных волокон языка при стимуляции рецепторов похожими вкусами. Например, в исследованиях солёного вкуса в качестве эталонного стимула чаще всего используют раствор хлорида натрия [17, 20, 23]. Однако существуют другие соединения (например, карбонат натрия), тоже обладающие солёным вкусом. Однако механизм их сенсорного различения практически не изучен. Показано, что импульсация *Chorda tympani*, возникающая в ответ на стимуляцию языка ионами натрия, значимо подавляется при блокаде эпителиальных натриевых каналов (ENaC) [20]. Это позволяет использовать блокаторы ENaC для отделения натрий-избирательного компонента ответа от активности неселективных солечувствительных нейронов для установления различий в активации волокон *Chorda tympani* NaCl и Na₂CO₃ [21, 22, 23]. Было выявлено, что при применении блокатора уровень импульсации *Chorda tympani* увеличивался в присутствии обоих видов солевых растворов. Однако ответ на предъявление 3 ммоль Na₂CO₃ был выражен сильнее, чем на стимуляцию 3 ммоль NaCl. После смывания раствора Na₂CO₃ с языка характер импульсации свидетельствовал о сохранении выраженного послевкусия, длительность которого зависела от концентрации применявшегося раствора.

Описания аналогичных исследований с использованием других органолептически схожих вкусовых композиций в доступной литературе обнаружены не были.

Данные, полученные в ходе нашего исследования, показали, что вкусовая стимуляция языка схожими стимулами, такими как апельсиновый сок, печенье с апельсиновым вкусом, леденец и жевательная конфета с апельсиновым вкусом, сопровождаются статистически значимыми отклонениями параметров афферентной импульсации афферентных волокон барабанной струны у крыс от контрольных значений. Полученные нами данные демонстрируют наличие двух основных компонентов ответа – фазического и тонического, что согласуется с данными Breza M. et al. [22, 23], описывающими неодинаковые изменения афферентной импульсации *Chorda tympani* в ответ на схожие на вкус стимулы.

Фазический компонент ответа в наших исследованиях характеризовался высокой амплитудой и короткой длительностью (около 8 мс), что соответствует результатам исследований Di Lorenzo and Victor, 2003 [14, 15], в которых также наблюдалась быстрая

начальная фаза реакции на вкусовые стимулы. При этом амплитуда фазического компонента ответа варьировала в зависимости от типа стимула. Наибольшие ее значения были зарегистрированы при стимуляции языка апельсиновым соком и леденцом, тогда как предъявление жевательной конфеты и печенья сопровождалось несколько меньшей амплитудой реакции. Это может быть связано с различиями не только в химическом составе, но и в агрегатном состоянии предъявляемого стимула, поскольку скорость и длительность высвобождения несущих вкус молекул из разных типов предъявляемых раздражителей различались в зависимости от их растворимости.

Тонический компонент ответа, напротив, отличался меньшей амплитудой и большей длительностью, что также соответствует данным, полученным Di Lorenzo and Victor, 2003 [14, 15]. Это может указывать на возможное влияние механической структуры стимула на продолжительность стимуляции.

Кроме того, в литературе описано явление последствия вкусовых стимулов, проявляющееся в сохранении измененного паттерна импульсации *Chorda tympany* после отмывки. В нашем исследовании оно было кратковременным и проявлялось в постепенном возвращении уровня импульсации к исходному в течение нескольких секунд после прекращения отмывки стимула. Однако при использовании в качестве раздражителей жевательной конфеты и леденца некоторые параметры (например, максимальная амплитуда и частота импульсации) восстанавливались не полностью. Это может свидетельствовать о более длительном последствии при использовании в качестве раздражителей субстанций, различающихся по своим механическим, химическим свойствам.

Заключение. Таким образом, анализ характера импульсации афферентных волокон барабанной струны крысы в ответ на стимуляцию языка апельсиновым соком, печеньем, леденцом и жевательной конфетой с апельсиновым вкусом позволил выявить достоверные отличия амплитудно-частотных характеристик ответа от уровня контроля. Наиболее выраженное увеличение частоты импульсации по сравнению с контрольными значениями наблюдалось при стимуляции апельсиновым соком что существенно превышало аналогичные показатели для других стимулов. Частота импульсации при предъявлении других стимулов со вкусом апельсина также, хотя и в меньшей степени, отличалась от контрольной, что может свидетельствовать о зависимости частотных характеристик ответа от разновидности стимула.

Исследование выполнено в рамках НИР ГПНИ ГР № 20211944, НИР БРФФИ № ГР 20241307

Литература:

- [1]. Ikui A. A review of objective measures of gustatory function // Acta Otolaryngol Suppl. 2002. № 546. P. 60–68.
- [2]. Kang M.G., Choi J.H., Kho H.S. Relationships between gustatory function tests // Oral Dis. 2020. Vol. 26, № 4. P. 830–837.
- [3]. Doty R.L., Shaman P., Dann M. Development of the University of Pennsylvania Smell Identification Test: a standardized microencapsulated test of olfactory function // Physiol Behav. 1984. Vol. 32, № 3. P. 489–502.
- [4]. Kobal G., Hummel T., Sekinger B. et al. "Sniffin' sticks": screening of olfactory performance // Rhinology. 1996. Vol. 34, № 4. P. 222–226.
- [5]. Hummel T., Whitcroft K.L., Andrews P. et al. Position paper on olfactory dysfunction // Rhinology. 2016. Vol. 56, № 1. P. 1–30.
- [6]. Heckmann J.G., Heckmann S.M., Lang C.J. et al. Neurological aspects of taste disorders // Arch Neurol. 2003. Vol. 60, № 5. P. 667–671.
- [7]. Kurihara K. Umami the Fifth Basic Taste: History of Studies on Receptor Mechanisms and Role as a Food Flavor // Biomed Res Int. 2015. Vol. 2015. P. 189402.
- [8]. Gilbertson T.A., Damak S., Margolskee R.F. The molecular physiology of taste transduction // Curr Opin Neurobiol. 2000. Vol. 10, № 4. P. 519–527.

- [9]. Smith D.V., St John S.J. Neural coding of gustatory information // Curr Opin Neurobiol. 1999. Vol. 9, № 4. P. 427–435.
- [10]. European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Strasbourg : Europ. Treaty Series, 1986. № 123. 48 p.
- [11]. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте. Киев : Вища школа, 1983. 383 с.
- [12]. Об ответственном обращении с животными [Электронный ресурс]: Модельный закон. Принят приложением к постановлению МПА СНГ от 27 марта 2017 г. № 46-15. URL: <http://www.parliament.am/library/modela-yin%20orenqner/356.pdf>.
- [13]. Руткевич С.А. Методологические подходы к изучению механизмов боли и соблюдение принципов биоэтики при работе с экспериментальными животными // Гуманное обучение специалистов медико-биологического профиля // сб. трудов научно-практического семинара. Минск. 2006. С. 76–77.
- [14]. Di Lorenzo P.M., Victor J.D. Taste response variability and temporal coding in the nucleus of the solitary tract of the rat // Journal of neurophysiology. 2003. Vol. 90. P. 1418–1431.
- [15]. Di Lorenzo P.M., Chen J.-Y., Victor J.D. Quality time: representation of a multidimensional sensory domain through temporal coding // The Journal of Neuroscience. 2009. Vol. 29. P. 9227–9238.
- [16]. Jones L.M., Fontanini A., Katz D.B. Gustatory processing: a dynamic systems approach // Curr Opin Neurobiol. 2006. Vol. 16, № 4. P. 420–428.
- [17]. St John S.J., Markison S., Spector A.C. Salt discriminability is related to number of regenerated taste buds after *Chorda tympani* nerve section in rats // Am J Physiol. 1995. Vol. 269. P. R141–R153.
- [18]. St John S.J., McBrayer A.M., Krauskopf E.E. Sodium Chloride to Sodium-Depleted Rats // Chem Senses. 2017. Vol. 42. P. 647–653.
- [19]. Nowlis G.H., Frank M.E., Pfaffmann C. Specificity of acquired aversions to taste qualities in hamsters and rats // J Comp Physiol Psychol. 1980. Vol. 94, № 5. P. 932–942.
- [20]. Heck G.L., Mierson S., DeSimone J.A. Salt taste transduction occurs through an amiloride-sensitive sodium transport pathway // Science. 1984. Vol. 223. P. 403–405.
- [21]. Breza J.M., Nikonov A.A., Contreras R.J. Response latency to lingual taste stimulation distinguishes neuron types within the geniculate ganglion // J Neurophysiol. 2010. Vol. 103. P. 1771–1784.
- [22]. Breza J.M., Contreras R.J. Acetic acid modulates spike rate and spike latency to salt in peripheral gustatory neurons of rats // J Neurophysiol. 2012. Vol. 108. P. 2405–2418.
- [23]. Breza J.M., Contreras R.J. Anion size modulates salt taste in rats // J Neurophysiol. 2012. Vol. 107. P. 1632–1648.

YU. I. RUDAK, A. M. SAVANEUSKAYA

NEURAL RESPONSES IN *CHORDA TYMPANI* FIBERS TO PERCEPTUALLY SIMILAR TASTES

Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

Summary

The study characterized parameters of afferent impulse activity in the rat *Chorda tympani* nerve in response to stimulation with organoleptically similar orange-flavored stimuli. Significant differences in frequency response characteristics were established. Orange juice caused the most pronounced increase in impulse frequency. The aftereffect period for solid stimuli was characterized by incomplete recovery of baseline impulse frequency.

Keywords: taste sensitivity, *Chorda tympani*, afferent impulse activity, rats, orange flavor.

Е. М. ТИТОВА¹, А. Г. ЧУМАК²

ВЕГЕТАТИВНАЯ РЕГУЛЯЦИИ РИТМА СЕРДЦА И РАБОТОСПОСОБНОСТЬ СПОРТСМЕНОВ СЛОЖНОКООРДИНАЦИОННЫХ ВИДОВ СПОРТА

¹ Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр спорта»,
г. Минск, Республика Беларусь

² Белорусский государственный университет, г. Минск, Республика Беларусь

В работе представлены данные о вариабельности ритма сердца 257 высококвалифицированных спортсменов, занимающихся сложнокординационными видами спорта (139 мужчин и 118 женщин) в возрасте от 15 до 35 лет в течение годового цикла подготовки. Установлена структура преобладания типов вегетативной регуляции у мужчин и женщин в различные периоды подготовки, связь типа вегетативной регуляции в покое с уровнем аэробной и анаэробной работоспособности спортсменов. Вегетативная регуляция мужчин и женщин с умеренным преобладанием автономного контура вегетативной регуляции имеет гендерные различия, учет которых позволит повысить эффективность тренировочного процесса.

Ключевые слова: вариабельность ритма сердца, аэробная работоспособность, анаэробная работоспособность, Вингейт-тест, сложнокординационные виды спорта.

Введение. Вегетативная регуляция (ВР) ритма сердца отражает адаптацию организма спортсмена к тренировочным нагрузкам различной направленности. Анализ текущего функционального состояния в покое позволяет с высокой долей вероятности прогнозировать функциональные возможности спортсменов и их работоспособность [1]. Уровень аэробной работоспособности, характеризующий кардиореспираторную выносливость спортсмена, и анаэробной работоспособности, характеризующий скоростно-силовую подготовленность являются объективными факторами, влияющим на результативность спортсменов [2]. За последние десятилетия увеличилось количество исследований о взаимосвязи ВР с работоспособностью, специализацией, возрастом, периодом подготовки спортсменов циклических, игровых видов спорта и единоборств [3–5]. Однако в научной литературе практически нет данных о работоспособности и ее связи с ВР у представителей сложнокординационных видов спорта, в структуре тренировочной деятельности которых скорость, сила и выносливость занимают не последнее место.

Вместе с тем, в соответствии с современными требованиями к работе научных лабораторий, деятельность которых связана с оценкой функционального состояния спортсменов, в них надлежит создавать собственные базы референсных значений показателей организма человека, позволяющих оценивать степень его соответствия установленным критериям. Такая база данных о результатах тестирования спортсменов высшей квалификации создана и поддерживается научным сотрудником лаборатории медико-биологических исследований РНПЦ спорта Титовой Е.М. [6]. Анализ отдельных показателей приведен в настоящей статье. Речь идет об оценке вариабельности ритма сердца (ВРС), аэробной и анаэробной работоспособности у спортсменов сложнокординационных видов спорта с учетом пола и типа преобладания ВР в покое.

Материалы и методы исследования. Исследование проводилось в период 2023–2024 года на базе Республиканского научно-практического центра спорта в лаборатории медико-биологических исследований. В нем приняли участие 257 спортсменов высокой квалификации, занимающихся сложнокординационными видами спорта (139 мужчин и 118 женщин) в возрасте от 15 до 35 лет в течение годового цикла подготовки. Физическая и

аэробная работоспособность оценивалась с помощью кардиореспираторного нагрузочного тестирования на спирометрическом комплексе Schiller, используя протокол со ступенчатовозрастающей нагрузкой. Мощность первой ступени составляла 50 Вт, длительность ступени – 1 минута, шаг нагрузки – 25 Вт. Уровень потребляемого кислорода и выделяемого углекислого газа измерялся каждые 10 секунд, фиксировались показатели газообмена, эргометрии и параметры кардиореспираторного ответа на нагрузку [7]. Для определения анаэробной работоспособности использовался Вингейт-тест с вертикальным эргометром Ergomedic 894E Peak Bike (Monark, Швеция). Спортсмены осуществляли педалирование с максимальной интенсивностью в течении 30 секунд с использованием отягощения в 7,5 % от массы тела. Определялись основные показатели скоростно-силовой подготовленности (пиковая мощность и время её достижения), скоростно-силовой выносливости (средняя мощность и индекс утомления) [8]. Для определения типа ВР использовалась регистрация временных и спектральных показателей ВРС, а также кардиоинтервалографии на аппаратно-программном комплексе «Поли-Спектр» (Нейрософт, Россия) до выполнения нагрузочного тестирования [9]. Полученные данные по результатам комплексных исследований были систематизированы и проанализированы с использованием статистических пакетов Excel 2021, STATISTICA 10.0. Исследуемые показатели были подвергнуты проверке на нормальность распределения с использованием критерия Шапиро-Уилка (W). В связи с тем, что значения количественных признаков характеризовались распределением, отличным от нормального, применялся расчет медианы (Me) и интерквартильный размах (ИКР) (25-й и 75-й процентиля – Q_{25} и Q_{75}). Для проверки статистической значимости полученных данных применялся непараметрический U-критерий Манна-Уитни, а силу и направленность связей между показателями в группах определяли с помощью r -коэффициента Спирмена (статистически значимые связи при $p < 0,05$). Исследование проводилось в соответствии с действующей версией Хельсинской декларации, принятой на 64-ой генеральной ассамблее Всемирной медицинской ассоциации (Форталеа, Бразилия, октябрь 2013). Все спортсмены дали письменное информированное согласие на участие в исследовании (одобreno локальным этическим комитетом (протокол от 12.05.2022 № 1)).

Результаты и их обсуждение. Согласно классификации преобладающих типов ВР ритма сердца, принятой в спортивной физиологии, Шлык Н. И. [10], участники обследования были разделены на четыре группы: I тип – умеренное преобладание центрального контура регуляции, II тип – выраженное преобладание центрального контура регуляции, III тип – умеренное преобладание автономного контура регуляции, IV тип – выраженное преобладание автономного контура регуляции. II тип – выраженное преобладание центрального контура регуляции, был зарегистрирован у 2 спортсменов и из анализа исключен, как предпатологический тип.

По данным программного анализа ВРС у мужчин зарегистрировано умеренное преобладание автономного контура регуляции (III тип) – у 52,5 % спортсменов и выраженное преобладание автономного контура регуляции (IV тип) – у 40,3 % спортсменов, умеренное преобладание центрального контура регуляции (I тип) – у 7,2 % спортсменов. У женщин распределение по типам преобладания регуляции вегетативной нервной системы (ВНС) выглядело следующим образом: I тип – у 11 % спортсменок, III тип – у 55,1 % спортсменок и IV тип – у 33,9 % спортсменок.

Основные показатели ВРС у высококвалифицированных спортсменов сложнокоординационных видов спорта представлены в таблице 1.

Таблица 1. Основные показатели ВРС спортсменов

Показатель ВРС	Me [Q ₂₅ ;Q ₇₅]					
	Тип I		Тип III		Тип IV	
	Мужчины (n=10)	Женщины (n=13)	Мужчины (n=73)	Женщины (n=65)	Мужчины (n=56)	Женщины (n=40)
TP, мс ²	1660 [1296;1865]	1599 [1323;1891]	4252 [2863;5877]	4236 [3301;5855]	9652 [7180;13795,5]	9585 [8127,5;12859,5]
VLF, мс ²	451, 5[395;563]	468 [360;1082]	1124 [778;1577]	1056,5 [763;1554]	2002,5 [1392,5;2655,5]	1907 [1215,5;3016,5]
LF, мс ²	423 [315;576]	334 [257;375]	934 [640;1353]	899 [592;1360]	1729 [1244,5;2962,5]	1801 [1178,5;2999,5]
HF, мс ²	595,5 [256;886]	539 [341;659]	1964 [1232;2936]	2247 [1457;2894]	5532,5 [3569;8658,5]	5435,5 [3970;8071]
LF HF	0,80 [0,53;1,43]	0,81 [0,50;1,33]	0,48 [0,31;0,92]	0,37 [0,27;0,62]	0,30 [0,22;0,54]	0,30 [0,18;0,54]
AMo, %	52,8 [48,2;55,3]	43 [40,6;55,1]	32,9 [28,7;38,9]	29,6* [26,6;35,5]	20,55 [18,25;22,8]	21,85 [19;26,45]
RMSSD, мс	34 [29;40]	31 [17;42]	67 [51;86]	72 [59;90]	128,5 [109;156]	126,5 [113,5;169]
pNN50, %	11,59 [5,62;17,5]	7,96 [1,77;19,70]	40,90 [24,30;57,80]	51,90* [37,70;62,40]	69,40 [59,60;74,90]	69,70 [65,20;76,35]

Примечание: * – достоверное отличие показателя у мужчин и женщин между группами в тип III, $p < 0,05$

Значимых отличий между значениями показателей ВРС у мужчин и женщин в группах с преобладанием центрального (I тип) и выраженного автономного контура регуляции (IV тип) не зарегистрировано. У женщин с умеренным преобладанием автономного контура ВР (III тип) показатель амплитуды моды (АМо, %) ниже, чем у мужчин (29,6 % и 32,9 % соответственно), а показатель pNN50, процент соседних кардиоинтервалов, отличающихся друг от друга более чем на 50 мс, выше (51,90 % и 40,90 % соответственно). Небольшие различия в показателе АМо могут указывать на удовлетворительное состояние сердечно-сосудистой системы как у мужчин, так и у женщин. Более высокие значения pNN50 у женщин свидетельствуют о более значительном воздействии их парасимпатической части ВНС на сердечный ритм.

Также проанализировано распределение типов преобладания ВР нервной системы у спортсменов в зависимости от периода подготовки. Тестирование в подготовительный период прошли 108 мужчин и 82 женщины, в соревновательном периоде – 21 мужчина и 22 женщины, в переходном периоде – 10 мужчин и 14 женщин.

Преобладание центрального контура регуляции (I тип) в подготовительном периоде зарегистрировано у 8 % мужчин и 11 % женщин, в соревновательном периоде – у 14 % женщин, а у мужчин не зарегистрировано. В переходном периоде – выявлено у 10 % мужчин и у 7 % женщин.

Умеренное преобладание автономного контура регуляции (III тип) в подготовительном периоде зарегистрировано у 56 % мужчин и 60 % женщин, в соревновательном периоде – у 33 % мужчин и 41 % женщин, в переходном периоде – у 60 % мужчин и 50 % женщин.

Выраженное преобладание автономного контура регуляции (IV тип) зарегистрировано в подготовительном периоде у 36 % мужчин и 29 % женщин, в соревновательном периоде – у 67 % мужчин и 45 % женщин, в переходном периоде – у 30 % мужчин и 43 % женщин.

Аэробная работоспособность спортсменов в зависимости от типа преобладания ВР. У мужчин в группе с выраженным преобладанием автономного контура регуляции (IV тип) показатель коэффициента работоспособности (КР, Вт/кг), характеризующий физическую

работоспособность, был выше, чем у мужчин с преобладанием центрального контура регуляции (I тип) (таблица 2). Показатель максимального потребления кислорода (МПК, л/мин), характеризующий аэробную работоспособность, ниже в группе с преобладанием центрального контура регуляции (I тип) по сравнению с группами умеренной и выраженной автономной ВР (III тип и IV тип соответственно).

Таблица 2. Основные показатели физической и аэробной работоспособности

Показатель	Me [Q ₂₅ ;Q ₇₅]					
	Мужчины			Женщины		
	Тип I (n=10)	Тип III (n=73)	Тип IV (n=56)	Тип I (n=13)	Тип III (n=65)	Тип IV (n=40)
Коэффициент работоспособности, Вт/кг	3,03 [2,74;3,49]	3,47 [3,06;3,87]	3,59** [3,27;3,98]	3,21 [2,77;3,54]	3,24 [2,99;3,52]	3,21 [2,96;3,44]
Максимальное потребление кислорода, л/мин	3,05 [2,52;3,24]	3,31* [3,02;3,77]	3,36** [3,05;3,77]	2,05 [1,78;2,56]	2,26 [2,06;2,45]	2,29 [2,07;2,66]
Максимальное потребление кислорода, мл/кг/мин	44,05 [38,17;48,41]	47,35 [42,90;51,44]	47,07 [43,54;52,92]	39,50 [37,08;45,67]	40,12 [37,41;44,90]	41,18 [37,76;43,62]

Примечание: * – достоверное отличие показателя у мужчин между группами I и III $p \leq 0,05$;

** – достоверное отличие показателя у мужчин между группами I и IV $p \leq 0,05$

У женщин с разным типом преобладания ВР различий между показателями, характеризующими физическую и аэробную работоспособность, не зарегистрировано.

Корреляционный анализ показателей ВРС и аэробной работоспособности у мужчин выявил, что КР, характеризующий физическую работоспособность, имел высокую положительную взаимосвязь с показателем общей мощности спектра (ТР, мс²) ($r = 0,818$, $p < 0,05$) и среднюю взаимосвязь с показателями мощности низкочастотных волн (LF, мс²) ($r = 0,660$, $p < 0,05$) и мощности высокочастотных волн (HF, мс²) ($r = 0,684$, $p < 0,05$) в группе мужчин с умеренным преобладанием центрального контура регуляции (I тип). Показатель МПК, мл/кг/мин, характеризующий аэробную работоспособность, у мужчин в этой группе имел среднюю положительную взаимосвязь с показателем LF ($r = 0,636$, $p < 0,05$). В группе мужчин с выраженным преобладанием автономного контура регуляции (IV тип) выявлена слабая отрицательная взаимосвязь показателя МПК, л/мин с показателями ТР ($r = -0,338$, $p < 0,05$) и HF ($r = -0,442$, $p < 0,05$). В группе мужчин с умеренным преобладанием автономной регуляции (III тип) выявлена слабая отрицательная взаимосвязь показателей аэробной работоспособности (МПК) и физической работоспособности (КР) с показателем LF/HF ($r = -0,351$ и $r = -0,362$ соответственно, $p < 0,05$).

У женщин с умеренной автономной регуляцией (III тип) показатель аэробной работоспособности (МПК) имел слабую положительную взаимосвязь с показателями LF ($r = 0,381$, $p < 0,05$) и LF/HF ($r = 0,257$, $p < 0,05$). У женщин с I и IV типом вегетативной регуляции корреляционных взаимосвязей показателей аэробной работоспособности с показателями ВРС не выявлено.

Анаэробная работоспособность (скоростно-силовая подготовленность и выносливость) спортсменов в зависимости от типа преобладания ВР.

Среднегрупповые показатели анаэробной работоспособности спортсменов представлены в таблице 3.

Таблица 3. Основные показатели анаэробной работоспособности

Показатель	Me [Q ₂₅ ;Q ₇₅]					
	Мужчины			Женщины		
	Тип I (n=10)	Тип III (n=73)	Тип IV (n=56)	Тип I (n=13)	Тип III (n=65)	Тип IV (n=40)
Пиковая мощность, Вт/кг	10,49 [8,76;11,46]	11,01 [9,72;12,25]	10,73 [9,51;12,05]	7,97 [6,49;8,99]	8,54 [7,425;9,82]	8,80 [8,07;9,82]
Средняя мощность, Вт/кг	7,55 [6,94;8,11]	7,74 [7,27;8,27]	7,88 [7,22;8,56]	5,70 [5,23;6,73]	6,41 [5,765;7,06]	6,54 [5,79;7]
Индекс утомления, Вт/кг/сек	0,21 [0,14;0,21]	0,20 [0,16;0,25]	0,18 [0,15;0,23]	0,13 [0,10;0,14]	0,14 [0,11;0,17]	0,16 [0,13;0,21]

По результатам Вингейт-теста уровень скоростно-силовой подготовленности по показателю пиковой мощности, у мужчин с преобладанием центрального (I тип) и выраженного автономного контура регуляции (IV тип) оценен как «низкий», а у мужчин с умеренной ваготонией (III тип) – «ниже среднего» [7]. Уровень скоростно-силовой выносливости по величине относительной средней мощности у всех мужчин оценен как «ниже среднего». У женщин с преобладанием центрального (I тип) и умеренного автономного контура регуляции (III тип) уровень скоростно-силовой подготовленности и скоростно-силовой выносливости оценен как «низкий», а у женщин с выраженной ваготонией (IV тип) – «ниже среднего».

У мужчин и женщин показатели пиковой мощности, средней мощности и индекса утомления, косвенно характеризующих скоростно-силовую выносливость, не имели достоверных различий между группами с разным типом преобладания ВР.

Выявлено, что у мужчин в группе с преобладанием центрального контура регуляции (I тип) пиковая мощность и средняя мощность имели среднюю положительную связь с мощностью спектра ($r = 0,672$ и $r = 0,660$ соответственно, $p < 0,05$). В группе с умеренным преобладанием автономного контура регуляции (III тип) показатель средней мощности имел слабую отрицательную связь с показателем LF/HF ($r = -0,285$, $p < 0,05$) и слабую положительную – с показателем HF ($r = 0,261$, $p < 0,05$). В группе с выраженным преобладанием автономного контура регуляции (IV тип) не выявлена взаимосвязь показателей анаэробной работоспособности с показателями ВРС.

У женщин в группе с преобладанием центрального контура регуляции (I тип) пиковая и средняя мощность имели сильную положительную связь с показателем мощности очень низкочастотного спектра ($r = 0,828$ и $r = 0,846$ соответственно, $p < 0,05$). В группе с умеренным преобладанием автономного контура регуляции (III тип) показатели пиковой и средней мощности имели слабую отрицательную связь с мощностью спектра и показателем рNN50 ($r = -0,301$ и $r = -0,384$ соответственно, $p < 0,05$), а показатель средней мощности имел слабую отрицательную связь с показателем HF ($r = -0,298$, $p < 0,05$). В группе с выраженным преобладанием автономного контура регуляции (IV тип) не выявлена взаимосвязь показателей анаэробной работоспособности с показателями ВРС.

В лаборатории медико-биологических исследований Государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр спорта» Министерства спорта и туризма Республики Беларусь, были зарегистрированы закономерности, совокупность которых может быть охарактеризована следующим образом.

Для спортсменов сложнокоординационных видов спорта характерно умеренное преобладание автономного контура ВР (III тип) в покое, как у мужчин (52,5 %), так и у женщин (55,1 %).

ВР мужчин и женщин с умеренным преобладанием автономного контура ВР (III тип) имеет гендерные различия: более высокие значения $pNN50$ у женщин свидетельствуют о большем воздействии парасимпатической части ВНС на сердечный ритм.

У мужчин и женщин в подготовительном периоде характерно умеренное преобладание (III тип) автономного контура регуляции (56 % и 60 % соответственно). В соревновательном периоде характерно выраженное преобладание (IV тип) автономного контура регуляции: у мужчин – 67 %, у женщин – 45 %. Переходный период характеризовался преобладанием умеренной (III тип) автономной регуляцией (56 % у мужчин и 60 % у женщин).

У мужчин с выраженным преобладанием автономного контура регуляции (IV тип) зарегистрированы самые высокие показатели аэробной работоспособности. Показатель МПК в этой группе спортсменов имел слабую отрицательную взаимосвязь с показателем общей мощности спектра ($r = -0,338$, $p < 0,05$) и высокочастотной области спектра ($r = -0,442$, $p < 0,05$), что свидетельствовало о снижении уровня аэробной работоспособности у мужчин в группе с выраженной ваготонией с ростом парасимпатического влияния ВНС в покое. У спортсменов с умеренным преобладанием центрального контура регуляции (I тип) показатели аэробной работоспособности ниже, чем у спортсменов с преобладанием автономной регуляции (III и IV тип). Показатели аэробной работоспособности у мужчин в этой группе имели положительную взаимосвязь с показателями общей мощности спектра, низкочастотных и высокочастотных компонентов спектра ($r = 0,660-0,818$, $p < 0,05$), что свидетельствовало о росте уровня аэробной работоспособности у мужчин в группе с умеренной симпатикотонией с ростом парасимпатического влияния ВНС в покое.

У женщин с разными типами ВР различий между показателями, характеризующими физическую и аэробную работоспособность, не зарегистрировано. Корреляционных взаимосвязей показателей аэробной работоспособности с показателями ВРС у женщин с умеренным центральным (I тип) и выраженным автономным (IV тип) типом регуляции не выявлено. У женщин с умеренной автономной регуляцией (III тип) выявлена слабая связь увеличения уровня аэробной работоспособности с ростом симпатического влияния ВНС в покое.

Показатели анаэробной работоспособности как у мужчин, так и у женщин не имеют различий между группами спортсменов, с различными типами вегетативной регуляции. Рост анаэробной работоспособности у мужчин с умеренной симпатикотонией (I тип) и умеренной ваготонией (III тип) связан с усилением влияния парасимпатического отдела ВНС в покое. У женщин с умеренной симпатикотонией (I тип) рост анаэробной работоспособности связан с усилением влияния симпатического отдела ВНС в покое, рост показателей анаэробной работоспособности женщин с умеренной ваготонией (III тип) тем выше, чем ниже влияние парасимпатического отдела ВНС в покое. У мужчин и женщин с выраженным преобладанием автономного контура регуляции в покое не выявлено взаимосвязи показателей анаэробной работоспособности с показателями ВРС в покое.

Полученные результаты указывают на существенную зависимость индивидуальных показателей спортивной результативности от состояния автономной регуляции функций. Вместе с тем, в современных публикациях подчеркивается [11], что существуют противоречивые данные относительно влияния различных типов физической нагрузки на параметры variability ритма сердца.

Признается, что два отдела автономной нервной системы по-разному вовлечены в состояние повышенной работоспособности (активация симпатических влияний с торможением парасимпатических) и восстановление состояния фона после прекращения интенсивной нагрузки (превалирование парасимпатического действия).

Заключение. Установленные закономерности в научной литературе не описаны. Имеются единичные сообщения, в которых приводятся референсные значения отдельных показателей ВРС молодых футболистов и хоккеистов [12]. Они не противоречат установленным в работе показателям отечественной популяции атлетов.

Аналогичные референсные значения параметров анаэробной работоспособности описаны в имеющихся немногочисленных публикациях, вышедших из зарубежных лабораторий [13]. Они согласуются с имеющимся в нашей базе данных показателями.

Собственные материалы могут использоваться для отбора и подготовки потенциально перспективных спортсменов.

Установленные закономерности ВР ритма сердца и работоспособности спортсменов сложнокоординационных видов спорта указывают на необходимость их учета в подготовительный и соревновательный периоды подготовки.

Литература:

- [1]. Гаврилова Е.А. Использование variability ритма сердца в оценке успешности спортивной деятельности // Практическая медицина. 2015. № 3-1 (88). С. 52–57.
- [2]. Кудря, О.Н., Белова Л.Е., Капилевич Л.В. Адаптация сердечно-сосудистой системы спортсменов к нагрузкам разной направленности // Вестн. Том. гос. ун-та. 2012. № 356. С.162–166.
- [3]. Литвин Ф.Б., Брук Т.М., Терехов П.А. Особенности анаэробной работоспособности биатлонистов в зависимости от типа вегетативной регуляции сердечного ритма. // Журнал медико-биологических исследований. 2020. Т.8, № 4. С. 368–377.
- [4]. Катаев Д.А., Циркин В.А., Кишкина В.В. и др. Общая мощность спектра и мощность HF-волн в зависимости от этапов годичного цикла подготовки спортсменов и других факторов (обзор) // Журнал медико-биологических исследований. 2024. Т. 12, №. 2. С. 253–267.
- [5]. Катаев Д.А., Циркин В.А., Кишкина В.В. и др. Природа общей мощности спектра и очень низкочастотных волн кардиоинтервалограммы с позиций адаптации организма человека к двигательной активности (обзор) // Журнал медико-биологических исследований. 2023. Т. 11, № 11. С. 95–107.
- [6]. Тумова Е.М. База данных «Комплексная база данных функционального состояния и физический работоспособности спортсменов в 2022-2024 гг. Информационная система. Свидетельство о государственной регистрации № 1772542770 от 05.05.2025
- [7]. Захаревич А.Л., Марченко Д.С., Тумова Е.М. Практические аспекты стресс-теста с газоанализом спортсменов различных видов спорта: практ. пособие. Минск: РНПЦ спорта, 2022. – 36 с.
- [8]. Zupan M.F., Arata A.W., Dawson L.H. et al. Wingate Anaerobic Test peak power and anaerobic capacity classifications for men and women intercollegiate athletes // J. Strength Cond Res. 2009. Vol. 23, № 9. P. 2598–2604.
- [9]. Баевский Р.М. Анализ variability сердечного ритма: физиологические основы и основные методы проведения // Cardiometry. – 2017. № 10. С. 66–76.
- [10]. Шлык Н.И. Variability сердечного ритма и методы ее определения у спортсменов в тренировочном процессе: метод. пособие. – Ижевск: Удмуртский университет, 2022. – 80 с.
- [11]. Marasingha-Arachchige S.U., Rubio-Arias J.Á., Alcaraz P.E. et al. Factors that affect heart rate variability following acute resistance exercise: A systematic review and meta-analysis. // J. Sport Health Sci. 2022. Vol.11, №3. P. 376–392.
- [12]. Ziadia H, Sassi I, Trudeau F, Fait P. Normative values of resting heart rate variability in young male contact sport athletes: Reference values for the assessment and treatment of concussion.// Front Sports Act Living. 2023. Vol. 4, № 730401 P. 1–16.
- [13]. Sitkowski D, Starczewski M, Klusiewicz A. Reference levels of mean and peak anaerobic power for male and female long-track speed skaters. // Biol Sport. 2025. Vol. 42, №2. P. 207–213.

**VAGOTONIC REGULATION OF HEART RHYTHM AND ATHLETES' WORK CAPACITY
IN COMPLEX COORDINATION SPORTS CONSIDERING THE DOMINANT TYPE OF
AUTONOMIC REGULATION**

¹ *State Institution "Republican Scientific and Practical Center of Sports", Minsk, Republic of Belarus*

² *Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus*

Summary

The study presents data on heart rate variability from 257 highly qualified athletes engaged in complex coordination sports (139 men and 118 women) aged 15 to 35 over the course of a one-year training cycle. It establishes the structure of predominance in types of autonomic regulation among men and women during different training periods, as well as the relationship between the type of autonomic regulation at rest and the levels of aerobic and anaerobic performance of the athletes. The autonomic regulation in both men and women, with a moderate predominance of the autonomic regulatory circuit, shows significant gender differences, the consideration of which could enhance the effectiveness of the training process.

Keywords: heart rate variability, aerobic performance, anaerobic performance, Wingate test, complex coordination sports.

Е. Н. ЧЕПЕЛЕВА, Ф. И. ВИСМОНТ

ОБ УЧАСТИИ КЛЕТОК КУПФЕРА В ПРОЦЕССАХ ДЕТОКСИКАЦИИ, ФОРМИРОВАНИЯ ТИРЕОИДНОГО СТАТУСА И ДИСЛИПИДЕМИИ У КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ПЕРИТОНИТОМ

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

Перитонит, несмотря на клинические успехи, по-прежнему сопровождается высокой летальностью вследствие развивающихся сепсиса и эндотоксинемии, а механизмы развития перитонита остаются до конца не изученными. Проведенные за последнее десятилетие исследования показали, что своевременная и качественная очистка крови от эндотоксинов, коррекция развивающейся дислипидемии в значительной степени зависят от детоксикационной и эндотоксинэлиминирующей функций печени, которые обеспечиваются гепатоцитами и клетками Купфера (КК), участие которых в механизмах поддержания гомеостаза, регуляции процессов жизнедеятельности и формирования защитно-приспособительных реакций при бактериальной эндотоксинемии очевидно, однако выяснение значимости данных клеток в регуляции процессов детоксикации, формирования тиреоидного статуса, обмена холестерина липопротеинов сыворотки крови при септических состояниях в условиях экспериментального перитонита не было предметом специального исследования.

Целью исследования явилось выяснение значимости активности КК в процессах детоксикации, формирования тиреоидного статуса и дислипидемии у крыс с экспериментальным перитонитом (cecal ligation and puncture (CLP)-модель). В результате исследования установлено, что активность КК имеет значимость в изменениях активностей аргиназы, детоксикационной функции печени, тиреоидного статуса, содержания общего холестерина в печени, холестерина липопротеинов в сыворотке крови, уровня нитритов/нитратов в плазме крови и температуры тела у крыс с экспериментальным перитонитом. Угнетение активности КК $GdCl_3$ (10 мг/кг) ослабляет развитие атерогенной дислипидемии, характерного изменения уровня трийодтиронина и содержания нитритов/нитратов в плазме крови, активности аргиназы и детоксикационной функции печени и температуры тела после CLP-операции.

Ключевые слова: перитонит, клетки Купфера, дислипидемия, тиреоидный статус, детоксикация, аргиназа, нитриты/нитраты, температура тела, крысы.

Введение. В настоящее время, несмотря на значительные успехи в лечении острых хирургических заболеваний органов брюшной полости, частота осложнений, в том числе развития перитонита, остается по-прежнему высокой и составляет 20–30 % (при тяжелых формах 50–80 %) [1]. Патогенез распространенного перитонита является сложным динамичным процессом, главенствующая роль в развитии которого отводится эндотоксинемии, обусловленной как накоплением в организме токсичных продуктов нарушенного обмена веществ, так и поступающими из брюшной полости токсинами [2].

Известно, что в процессах детоксикации в условиях эндотоксинемии задействованы две большие популяции клеток печени: гепатоциты и звездчатые макрофаги (клетки Купфера (КК)), которые, с одной стороны, элиминируют из кровотока эндотоксины, а с другой – активируются последними и продуцируют во внутреннюю среду организма, в том числе в кровь, огромное количество физиологически активных веществ (интерлейкины, фактор некроза опухолей, колониестимулирующие факторы и др.) – важнейших «медиаторов» острофазного ответа и воспаления [3].

Показано, что бактериальная эндотоксинемия при перитоните, сопровождающаяся гиперпродукцией провоспалительных медиаторов и цитокинов, в значительной мере обусловлена активацией КК и приводит к изменению функционального состояния гепатоцитов и метаболизма основных энергетических и пластических субстратов, который характеризуется значительным преобладанием распада веществ над их утилизацией (синдром гиперметаболизма) [4]. Проблеме нарушений обмена холестерина (ХС) липопротеинов (ЛП) крови при различных септических состояниях, действии бактериальных эндотоксинов посвящено большое количество работ отечественных и зарубежных авторов [2, 5–8]. Показано, что большинство патологических состояний, сопровождающихся бактериальной эндотоксинемией или бактериемией, вызывают заметную перестройку всех видов обмена, в том числе и липидного [7, 9–12]. Однако особенности гуморальной регуляции уровня ХС ЛП плазмы крови при бактериальной эндотоксинемии в условиях перитонита остаются не выясненными. Как известно, КК печени принадлежит важная роль в обезвреживании бактериальных эндотоксинов. Несмотря на то, что КК составляют не более 10 % всех клеток печени, они играют важную роль в борьбе с инфекционными осложнениями, составляя до 90 % макрофагов в организме человека [13]. КК, выполняя фагоцитирующую функцию, метаболизируют различные вещества липидной природы, расщепляют белковые комплексы и мелкие частицы, а также удаляют из кровотока апоптотические клетки.

Среди многочисленных сдвигов в обменных процессах при септических состояниях, сопровождающихся эндотоксинемией, особую роль играют изменения метаболизма липидов тканей и крови [14]. Известно, что ХС и другие липиды являются не только основным структурно-функциональным компонентом биологических мембран и субстратом для стероидогенеза, но и служат источником свободных радикалов, а также участвуют в регуляции сосудистого тонуса, реакциях гемостаза, процессах внутриклеточной передачи сигнала, развитии воспаления, что во многом определяет течение и исход многих патологических состояний, сопровождающихся бактериальной эндотоксинемией [15].

Одной из важнейших функций ЛП крови при инфекционных и септических состояниях является их участие в процессах детоксикации организма. Показано, что различные классы липопротеинов крови (как липопротеины высокой плотности (ЛПВП), так и липопротеины низкой плотности (ЛПНП)) связывают бактериальные эндотоксины, поступающие в кровоток при различных инфекциях, и тем самым снижают их патогенное действие в организме [16, 17]. Кроме того, ХС ЛП как важнейший субстрат для стероидогенеза в надпочечниках, играет важную роль в формировании адекватной ответной реакции организма на инфекцию и действие других повреждающих факторов [18].

Известно, что выраженность эндотоксинемии определяется состоянием детоксикационной функции печени и системы гипофиз-щитовидная железа. Так, рядом исследователей показано, что печень играет важную роль в метаболизме гормонов щитовидной железы, обеспечивает регуляцию их обмена и поддержание оптимального уровня в крови. Установлено, что от функционального состояния печени зависит интенсивность процессов дейодирования йодсодержащих гормонов щитовидной железы, имеющих важное значение в процессах детоксикации и терморегуляции [19].

Показано, что тиреоидные гормоны обладают многочисленными биологическими эффектами, оказывая стимулирующее действие на протекание большинства биохимических процессов. Показано, что от уровня йодсодержащих гормонов щитовидной железы зависит состояние энергетического и пластического обмена, а также процессов теплообмена в норме и при патологии [20–22].

Исходя из вышеизложенного есть основания полагать, что повреждающее действие различного рода токсинов, равно как и их элиминация печенью во многом определяется состоянием тиреоидного статуса организма, однако механизмы участия тиреоидных гормонов в регуляции детоксикационной функции печени и теплообмена остаются во многом неизученными.

Таким образом, участие КК в механизмах поддержания гомеостаза, регуляции процессов жизнедеятельности и формирования защитно-приспособительных реакций при бактериальной эндотоксинемию очевидно и вполне закономерно. Однако выяснение значимости КК в регуляции процессов детоксикации при перитоните не было предметом специального исследования. Также до сих пор остается неясным значение КК в формировании тиреоидного статуса, влиянии на активность аргиназы печени, обмен ХС ЛП сыворотки крови и температуру тела крыс при септических состояниях в условиях экспериментального перитонита.

Целью данной работы было выяснение значимости активности КК в процессах детоксикации, формировании тиреоидного статуса и дислипидемии у крыс с экспериментальным перитонитом.

Материалы и методы исследования. Исследование выполнено на 192 взрослых белых крысах-самцах массой 180–220 г. Эксперименты проводились в соответствии с этическими нормами обращения с лабораторными животными и требованиями директив Европарламента и Совета Европейского союза (2010/63/EU), регулирующих использование животных в научных целях [23].

До постановки эксперимента животных адаптировали к условиям вивария. Они получали полноценный пищевой рацион в соответствии с правилами содержания лабораторных животных [24]. Питательный режим соответствовал принципу *ad libitum*. В связи с имеющимися в литературе данными о том, что у животных в течение суток происходят значительные колебания содержания ряда гормонов и биогенных аминов в крови, которые сопровождаются изменениями в энергетическом и пластическом обмене, опыты проводили в строго определенное время (8–12 ч утра), соблюдая термонейтральные условия (20–22 °С).

Для создания экспериментального перитонита использована модель лигирования и последующего однократного пунктирования слепой кишки – CLP (cecal ligation and puncture) [25, 26]. Для этого крысам под гексеналовым наркозом (100 мг/кг, внутривенно (в/в)) производили двухсантиметровый разрез передней брюшной стенки, через который извлекали слепую кишку. Затем ниже илеоцекального клапана на кишку накладывали лигатуру и однократно пунктировали ее иглой с внешним диаметром 1,3 мм (18 gauge). Пасаж пищевых масс при этом не нарушался. По данным литературы, через 18–24 ч после CLP-операции у животных развивается тяжелый полимикробный сепсис, который сопровождается выраженной полиорганной недостаточностью. В качестве контроля использовали ложнопериоперированных (ЛО) крыс, которым под наркозом проводили разрез передней брюшной стенки без извлечения и пунктирования слепой кишки. Всем животным ушивали брюшную стенку и через 30 мин после оперативного вмешательства подкожно вводили 2,5 мл изотонического раствора хлорида натрия. Схематическое изображение CLP-операции у крыс представлено на рисунке 1.

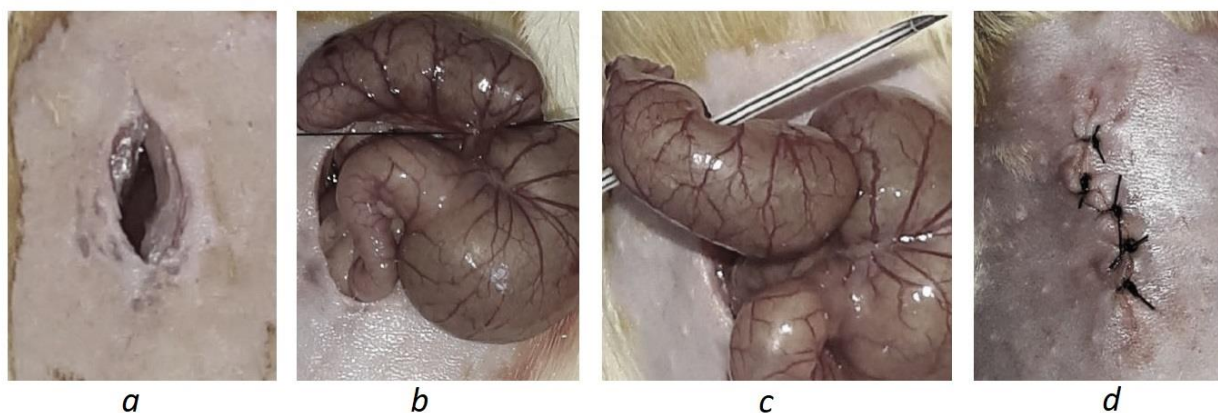


Рисунок 1. Схематическое изображение CLP-операции у крыс: а – выполнен продольный разрез передней брюшной стенки; б – осуществлено извлечение слепой кишки и ниже илеоцекального клапана наложена лигатура; в – выполнено однократное пунктирование слепой кишки иглой; г – возвращена слепая кишка в брюшную полость и осуществлено ушивание брюшной стенки

Декапитацию животных проводили через 24 ч после лигирования и пунктирования слепой кишки или ложной операции. Взятие для исследования крови, ткани печени у контрольных и опытных животных проводилось сразу после декапитации. Суммарную фракцию липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП) и ЛПНП из сыворотки крови выделяли путем осаждения по методу М. Burstein и J. Samaille [27]. Для определения содержания общего ХС, ХС ЛПВП в сыворотке крови и ХС в тканевых гомогенатах проводили экстракцию липидов по методу М. А. Креховой, М. К. Чехрановой [28]. Содержание ХС в сухих липидных экстрактах сыворотки крови оценивали с помощью реакции Либермана-Бурхарда, а содержание ХС суммарной фракции ЛПОНП + ЛПНП – по формуле $\text{ХС ЛПОНП} + \text{ЛПНП} = \text{общий ХС сыворотки крови} - \text{ХС ЛПВП}$.

Коэффициент атерогенности (Ка) рассчитывали по следующей формуле: $\text{Ка} = (\text{ХС ЛПОНП} + \text{ЛПНП}) / \text{ХС ЛПВП}$.

С целью выяснения значимости активности КК в исследуемых процессах при CLP-перитоните использовали селективный ингибитор КК GdCl_3 . Водный раствор GdCl_3 в дозе 10 мг/кг (дозе, подавляющей эндотоксин обезвреживающую функцию КК [29, 30]) вводили крысам в/б 1 раз в неделю в течение 8 недель. В указанной дозе данный ингибитор широко используется в экспериментальной практике с целью выяснения значимости КК в процессах жизнедеятельности [31, 32]. Контрольным группам крыс 1 раз в неделю в течение 8 недель в/б вводили 1,0 мл физиологического раствора (физ. р-р).

Продукцию NO оценивали по суммарному уровню в плазме крови нитратов/нитритов (NO_x) [33]. Содержание общего и свободного трийодтиронина (T_3) и тироксина (T_4) в плазме крови определяли радиоиммунологическим методом с использованием наборов реактивов РИА- T_3 -СТ, РИА- T_3 -свободный-СТ, РИА- T_4 -СТ и РИА- T_4 -свободный производства УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси». Тяжесть поражения печени оценивали по изменению соотношения активности АлАТ и АсАТ ($\text{АлАТ}/\text{АсАТ}$) в сыворотке крови. Активность АлАТ и АсАТ в плазме крови определяли колориметрическим динитрофенилгидрозиновым методом [34]. Активность аргиназы печени определяли спектрофотометрически по методике, предложенной J.W. Geyeri, B. Dabich [35].

О детоксикационной функции печени, степени эндогенной интоксикации судили по продолжительности наркотического сна (ПНС), концентрации в плазме крови фракции «средних молекул» (СМ) и степени токсичности крови (СТК). Определение содержания СМ производили методом кислотно-этанольного осаждения, разработанным В. М. Моиным с соавт. [36], СТК-способом, предложенным О. А. Радьковой с соавт. [37]. О ПНС у крыс (гексенал 100,0 мг/кг, в/б) судили по времени нахождения животных в боковом положении.

В исследовании использовались следующие экспериментальные группы:

Интактные (n = 18) – интактные крысы;

ЛО (n = 18) – ложнооперированные крысы, которым под наркозом проводили разрез передней брюшной стенки без извлечения и пунктирования слепой кишки;

CLP-перитонит (n = 27) – крысы, которым выполняли CLP-операцию;

Контроль + физ. р-р (n = 18) – крысы, которым в/б вводили 1,0 мл физраствора 1 раз в неделю в течение 8 недель;

Контроль + GdCl_3 (n = 18) – крысы, которым в/б вводили GdCl_3 в дозе 10 мг/кг 1 раз в неделю в течение 8 недель;

ЛО + физ. р-р (n = 18) – крысы, которым в/б вводили 1,0 мл физраствора 1 раз в неделю в течение 8 недель и после этого выполняли ложную операцию;

ЛО + GdCl_3 (n = 18) – крысы, которым в/б вводили GdCl_3 в дозе 10 мг/кг 1 раз в неделю в течение 8 недель и после этого выполняли ложную операцию;

CLP-перитонит + физ. р-р (n = 29) – крысы, которым в/б вводили 1,0 мл физраствора 1 раз в неделю в течение 8 недель и после этого выполняли CLP-операцию;

CLP-перитонит + GdCl_3 (n = 28) – крысы, которым в/б вводили GdCl_3 в дозе 10 мг/кг 1 раз в неделю в течение 8 недель и после этого выполняли CLP-операцию.

В группах CLP-перитонит, CLP-перитонит + ФР и CLP-перитонит + $GdCl_3$ через 24 ч после CLP-операции отмечалась следующая выживаемость животных: 66,7 %, 62,1 % и 64,3 % соответственно.

У всех животных с помощью электротермометра ТПЭМ-1 (НПО «Медфизприбор», Российская Федерация) измеряли ректальную температуру.

Достоверность различий между группами показателей оценивали по t-критерию Стьюдента для независимых выборок. Все данные представлялись в виде среднего арифметического и ошибки среднего арифметического ($\bar{X} \pm Sx$). Результаты считали статистически значимыми при значениях $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Опыты показали, что через 24 ч после CLP-операции у крыс развиваются некротические изменения в слепой кишке, отмечаются перитонит с выпотом в брюшную полость и парез кишечника, имеются выраженные признаки генерализованной воспалительной реакции: адинамия, вялость, в большинстве случаев – геморрагический конъюнктивит и диарея.

Установлено, что в условиях экспериментального перитонита через 24 ч после CLP-операции ректальная температура снижалась на $1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($p < 0,01$): с $37,8 \pm 0,15\text{ }^{\circ}\text{C}$ у ЛО крыс ($n = 10$) до $36,8 \pm 0,25\text{ }^{\circ}\text{C}$ у крыс с CLP-перитонитом ($n = 10$). В/б введение $GdCl_3$ (10 мкг/кг) 1 раз в неделю в течение 8 недель в группах Контроль + $GdCl_3$ ($n = 10$) и ЛО + $GdCl_3$ ($n = 10$)) приводило к статистически не значимому повышению температуры тела на $0,4\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ соответственно по отношению к величине ректальной температуры у животных в контролях, которым в/б вводили физ. раствор (группы Контроль + физ. р-р ($n = 10$) и ЛО + физ. р-р ($n = 10$) соответственно). По имеющимся литературным данным ингибитор КК $GdCl_3$ может вызывать изменения в теплообмене, детоксикации и метаболизме тиреоидных гормонов [38]. Депрессия КК $GdCl_3$ ослабляла развитие характерных изменений температуры тела у крыс с CLP-перитонитом. Температура тела у крыс, которым предварительно до CLP-операции в/б вводили $GdCl_3$ (10 мкг/кг) 1 раз в неделю в течение 8 недель, через 24 ч после CLP-операции была на $1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ выше ($p < 0,05$; $n = 10$), чем у животных с экспериментальным перитонитом, получившими 1,0 мл физраствора ($n = 10$) (рисунок 2).

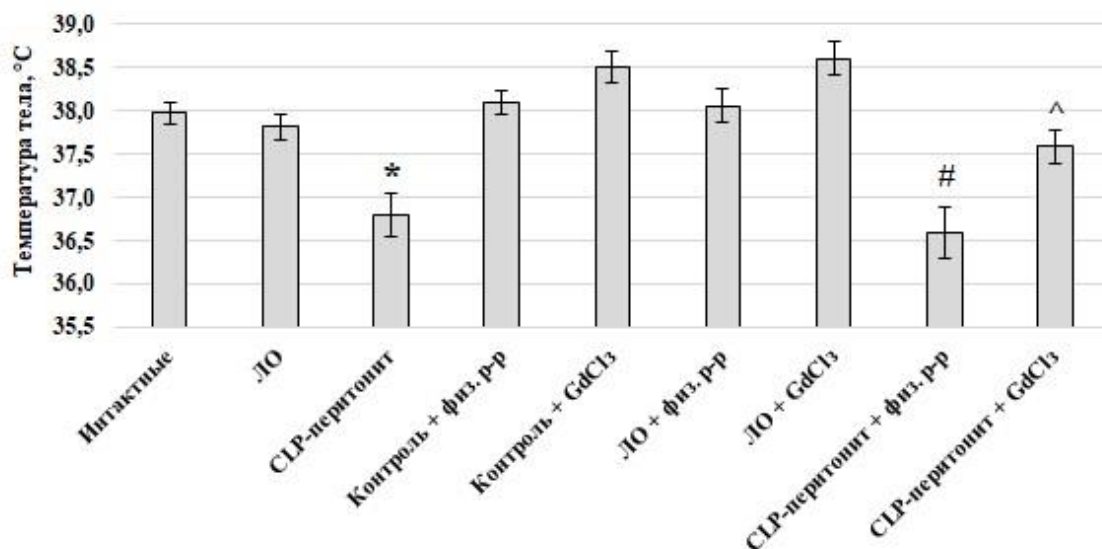


Рисунок 2. Температура тела у крыс с экспериментальным перитонитом в условиях депрессии КК $GdCl_3$ (10 мкг/кг). Примечание: * – $p < 0,01$ по отношению к группе ЛО, # – $p < 0,01$ по отношению к группе ЛО + физ. р-р, ^ – $p < 0,05$ по отношению к группами CLP-перитонит + физ. р-р и ЛО + $GdCl_3$

Выявлено, что содержание общего ХС в печени крыс через 24 часа после CLP-операции повышалось на 37,2 % ($p < 0,01$): у ЛО животных ($n = 10$) оно составляло $0,235 \pm 0,016$ мг/100 мг ткани, а у крыс с CLP-перитонитом ($n = 10$) – $0,321 \pm 0,018$ мг/100 мг ткани. Кроме этого, имело место повышение содержания общего ХС в сыворотке крови на 23,7 % ($p < 0,05$) – с $2,66 \pm 0,14$ ммоль/л у ЛО крыс ($n = 10$) до $3,29 \pm 0,17$ ммоль/л у крыс с CLP-перитонитом ($n = 10$), а также отмечались выраженные изменения в содержании ХС различных классов ЛП в сыворотке крови крыс: содержание ХС ЛПВП снижалось на 42,4 % ($p < 0,01$) – с $1,32 \pm 0,18$ ммоль/л у ЛО крыс ($n = 10$) до $0,76 \pm 0,08$ ммоль/л у крыс с CLP-перитонитом ($n = 10$), содержание ХС ЛПОНП + ЛПНП повышалось на 88,8 % ($p < 0,001$) – с $1,34 \pm 0,07$ ммоль/л у ЛО крыс ($n = 10$) до $2,53 \pm 0,13$ ммоль/л у крыс с CLP-перитонитом ($n = 10$). Установлено, что в условиях CLP-перитонита имело место возрастание Ка на 185,8 % ($p < 0,001$): с $1,27 \pm 0,23$ ед. у ЛО крыс ($n = 10$) до $3,63 \pm 0,40$ ед. у животных с CLP-перитонитом ($n = 10$).

Установлено, что развитие CLP-перитонита у крыс в условиях депрессии КК с помощью $GdCl_3$ сопровождается менее выраженными изменениями содержания общего ХС в печени и сыворотке крови, а также ХС различных классов ЛП в сыворотке крови и Ка. Так, содержание общего ХС в печени крыс в группе CLP-перитонит + $GdCl_3$ ($n = 10$) в сравнении с группой CLP-перитонит + физ. р-р ($n = 10$) снижалось на 17,5 % ($p < 0,05$): с $0,325 \pm 0,020$ мг/100 мг ткани до $0,268 \pm 0,016$ мг/100 мг ткани. В данных условиях имело место снижение содержания общего ХС в сыворотке крови на 19,6 % ($p < 0,05$): от $3,44 \pm 0,13$ ммоль/л у крыс в группе CLP-перитонит + физ. р-р ($n = 10$) до $2,64 \pm 0,13$ ммоль/л у крыс в группе CLP-перитонит + $GdCl_3$ ($n = 10$). У крыс с CLP-перитонитом в условиях депрессии КК $GdCl_3$ были обнаружены и выраженные изменения содержания ХС в различных классах ЛП крови, в частности понижение содержания ХС ЛПОНП + ЛПНП в сыворотке крови на 50,8 % ($p < 0,001$): от $2,54 \pm 0,14$ ммоль/л у крыс в группе CLP-перитонит + физ. р-р ($n = 10$) до $1,25 \pm 0,10$ ммоль/л у крыс в группе CLP-перитонит + $GdCl_3$ ($n = 10$), а также повышение содержания ХС ЛПВП в сыворотке крови на 54,4 % ($p < 0,05$): с $0,90 \pm 0,14$ ммоль/л у крыс в группе CLP-перитонит + физ. р-р ($n = 10$) до $1,39 \pm 0,16$ ммоль/л у крыс в группе CLP-перитонит + $GdCl_3$ ($n = 10$). Также в этих условиях имело место снижение Ка на 67,4 % ($p < 0,01$): с $3,53 \pm 0,64$ ед. у крыс в группе CLP-перитонит + физ. р-р ($n = 10$) до $1,15 \pm 0,27$ ед. у крыс в группе CLP-перитонит + $GdCl_3$ ($n = 10$). Данные о содержании общего ХС в печени и сыворотке крови, а также ХС различных классов ЛП в сыворотке крови и Ка у крыс с экспериментальным перитонитом (CLP-модель) в условиях действия в организме животных депрессии КК $GdCl_3$ представлены на рисунке 3.

Развитие перитонита у крыс ($n = 10$) сопровождалось повышением активности АЛАТ в сыворотке крови по сравнению с данным показателем у ЛО животных ($n = 10$) на 183,9 % ($p < 0,001$): активность составляла $0,62 \pm 0,04$ мккат/л у ЛО крыс и $1,76 \pm 0,11$ мккат/л у опытных животных после CLP-операции. Активность АсАТ в плазме крови крыс в этих условиях по сравнению с ЛО животными повышалась на 33,8 % ($p < 0,05$) и составляла $0,65 \pm 0,05$ мккат/л у ЛО крыс ($n = 10$) и $0,87 \pm 0,08$ мккат/л у опытных животных ($n = 10$). Соотношение активности АсАТ/АЛАТ у животных после CLP-операции снизилось на 53,6 % ($p < 0,01$) и составило $1,10 \pm 0,12$ у ЛО крыс ($n = 10$) и $0,51 \pm 0,06$ у животных с CLP-перитонитом ($n = 10$).

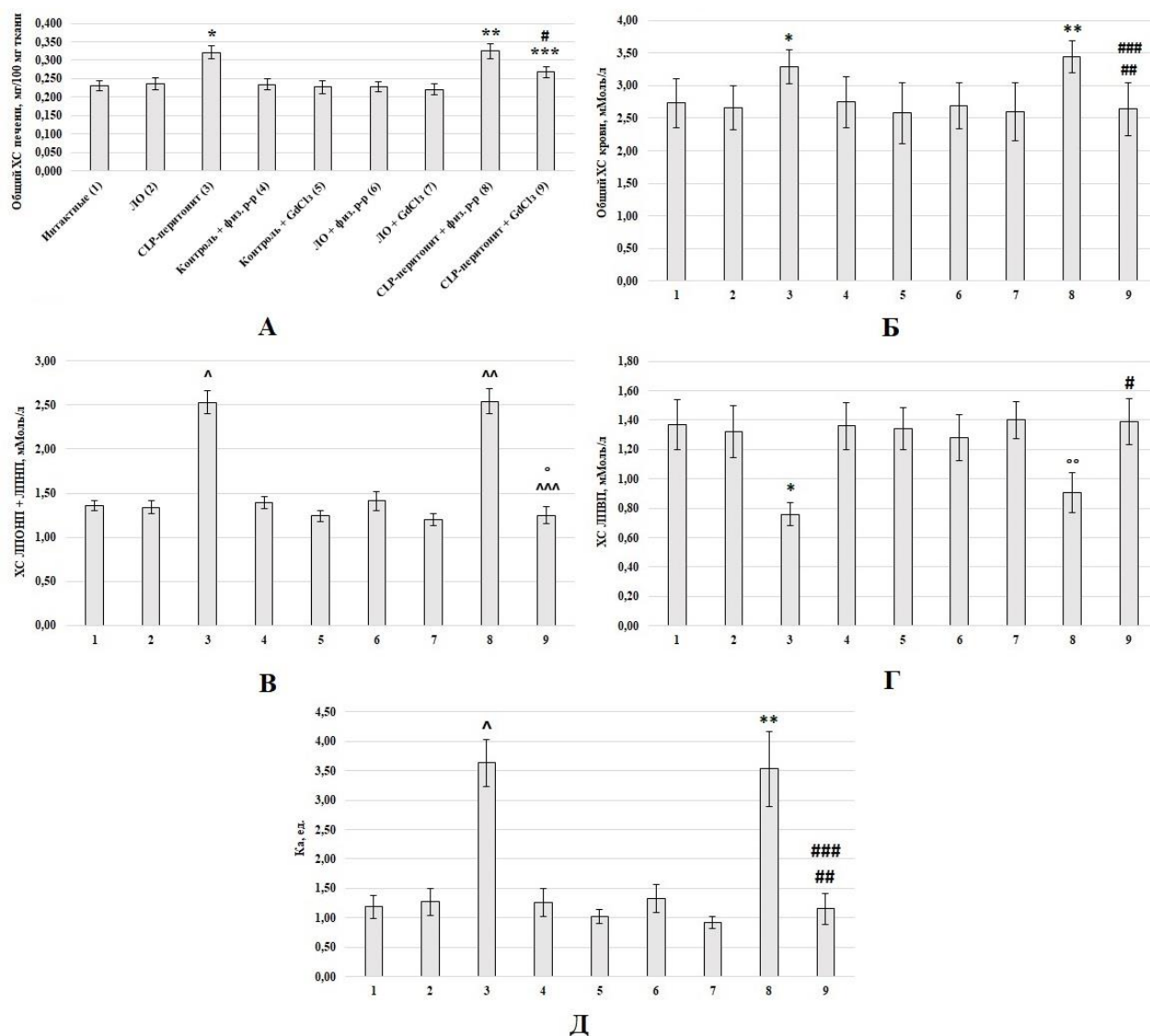


Рисунок 3. Содержание общего ХС в печени (А) и сыворотке крови (Б), а также ХС в различных классах ЛП сыворотки крови (В, Г) и Ка (Д) у крыс с экспериментальным перитонитом в условиях депрессии КК GdCl₃ (10 мг/кг). Примечание: * – $p < 0,01$ по отношению к группе ЛО, ** – $p < 0,01$ по отношению к группе ЛО + физ. р-р, *** – $p < 0,01$ по отношению к группе ЛО + GdCl₃, # – $p < 0,05$ по отношению к группе CLP-перитонит + физ. р-р, ## – $p < 0,05$ по отношению к группе ЛО + GdCl₃, ### – $p < 0,01$ по отношению к группе CLP-перитонит + физ. р-р, ^ – $p < 0,001$ по отношению к группе ЛО, ^^ – $p < 0,001$ по отношению к группе ЛО + физ. р-р, ^^^ – $p < 0,001$ по отношению к группе ЛО + GdCl₃, ° – $p < 0,001$ по отношению к группе CLP-перитонит + физ. р-р, °° – $p < 0,05$ по отношению к группе ЛО + физ. р-р

Активность АсАТ и АлаТ в сыворотке крови крыс при развитии перитонита в условиях депрессии КК (CLP-перитонит + GdCl₃, $n = 10$) по сравнению с животными с перитонитом, получившими физ. р-р (CLP-перитонит + физ. р-р, $n = 10$) статистически не значимо повышалась на 15,6 % ($p > 0,05$) и 10,5 % ($p > 0,05$) соответственно. Соотношение активности АсАТ/АлаТ в данных условиях также статистически не значимо повышалось на 10,9 % ($p > 0,05$). Таким образом, в/б введение GdCl₃ (10 мкг/кг) 1 раз в неделю в течение 8 недель как в условиях CLP-перитонита, так и у животных без него значимо не сказывалось на активностях АсАТ и АлаТ в сыворотке крови и соотношении активности АсАТ/АлаТ (рисунок 4).

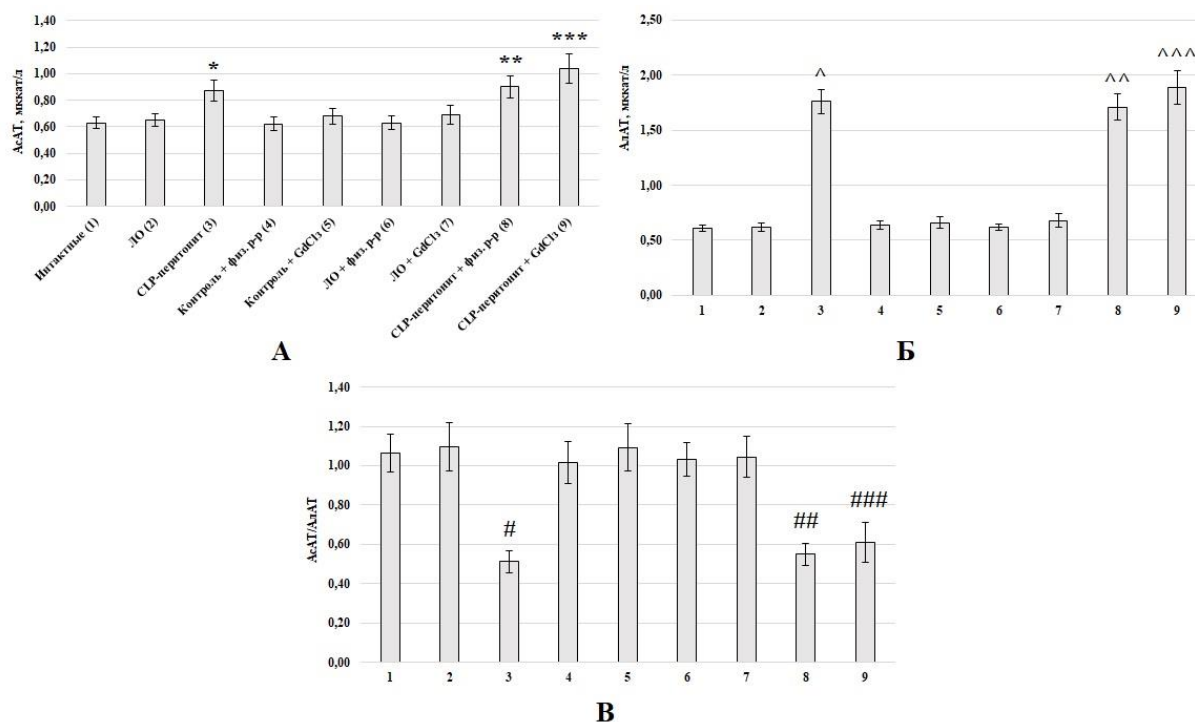


Рисунок 4. Активности АсАТ (А) и АлАТ (Б) в сыворотке крови и соотношении активности АсАТ/АлАТ (В) у крыс с экспериментальным перитонитом в условиях депрессии КК GdCl₃ (10 мг/кг). Примечание: * – $p < 0,05$ по отношению к группе ЛО, ** – $p < 0,05$ по отношению к группе ЛО + физ. р-р, *** – $p < 0,05$ по отношению к группе ЛО + GdCl₃, ^ – $p < 0,001$ по отношению к группе ЛО, ^^ – $p < 0,001$ по отношению к группе ЛО + физ. р-р, ^^^ – $p < 0,001$ по отношению к группе ЛО + GdCl₃, # – $p < 0,01$ по отношению к группе ЛО, ## – $p < 0,01$ по отношению к группе ЛО + физ. р-р, ### – $p < 0,01$ по отношению к группе ЛО + GdCl₃

Обнаружено, что при перитоните в организме крыс через 24 ч после CLP-операции имело место снижение в плазме крови содержания Т₄ на 31,4 % ($p < 0,01$): с $49,32 \pm 3,08$ нМоль/л у ЛО крыс ($n = 10$) до $33,85 \pm 2,26$ нМоль/л у опытных животных ($n = 10$). Кроме этого, отмечалось снижение в плазме крови уровня Т₃ на 30,5 % ($p < 0,05$): с $1,67 \pm 0,14$ нМоль/л у ЛО крыс ($n = 10$) до $1,16 \pm 0,14$ нМоль/л у опытных животных ($n = 10$). При этом в данных условиях уровни сТ₄ и сТ₃ снижались на 33,2 % ($p < 0,001$) и на 34,0 % ($p < 0,05$) соответственно. Содержание сТ₄ снижалось с $13,95 \pm 0,57$ пМоль/л у ЛО крыс ($n = 10$) до $9,32 \pm 0,34$ пМоль/л у опытных животных ($n = 10$), а сТ₃ снижалось с $3,76 \pm 0,34$ пМоль/л у ЛО крыс ($n = 10$) до $2,48 \pm 0,26$ пМоль/л у опытных животных ($n = 10$).

Установлено, что действие в организме крыс ингибитора КК GdCl₃, который 1 раз в неделю в течение 8 недель в/б вводился в дозе 10 мг/кг, сопровождается через 24 ч после последнего введения препарата изменением уровня йодсодержащих гормонов щитовидной железы и их свободных фракций в плазме крови. Через 24 ч после введения препарата в группе Контроль + GdCl₃ ($n = 10$) повышался уровень Т₃ в плазме крови у крыс на 30,6 % ($p < 0,05$) до $2,22 \pm 0,17$ нМоль/л, а уровень Т₄ в крови был на 29,4 % ($p < 0,01$) ниже, чем в группе Контроль + физ. р-р ($n = 10$) и составил $37,52 \pm 2,67$ нМоль/л. При этом содержание сТ₃ в плазме крови в данных условиях повышалось на 43,5 % ($p < 0,05$): с $3,86 \pm 0,39$ пМоль/л в группе Контроль + физ. р-р ($n = 10$) до $5,54 \pm 0,47$ пМоль/л в группе Контроль + GdCl₃ ($n = 10$), а сТ₄ в плазме крови понижалось на 28,4 % ($p < 0,001$): с $14,28 \pm 0,68$ пМоль/л в группе Контроль + физ. р-р ($n = 10$) до $10,22 \pm 0,49$ пМоль/л в группе Контроль + GdCl₃ ($n = 10$).

Депрессия КК GdCl₃ ослабляла развитие характерных после CLP-операции изменений уровня йодсодержащих гормонов щитовидной железы, в частности препятствовало и практически устраняло снижение уровня Т₃ в плазме крови у крыс с CLP-перитонитом.

Показано, что у крыс в группе CLP-перитонит + $GdCl_3$ ($n = 10$) в сравнении с группой CLP-перитонит + физ. р-р ($n = 10$) уровень T_3 в плазме крови повышался на 45,5 % ($p < 0,05$): с $1,12 \pm 0,10$ нМоль/л до $1,63 \pm 0,15$ нМоль/л, а уровень T_4 понижался на 29,4 % ($p < 0,01$): с $32,14 \pm 2,09$ нМоль/л до $23,18 \pm 1,78$ нМоль/л. В этих условиях cT_3 в плазме крови повышался на 61,0 % ($p < 0,05$): с $2,41 \pm 0,24$ пМоль/л в группе CLP-перитонит + физ. р-р ($n = 10$) до $3,88 \pm 0,41$ пМоль/л в группе CLP-перитонит + $GdCl_3$ ($n = 10$), а cT_4 в плазме крови понижалось на 13,3 % ($p < 0,05$): с $9,16 \pm 0,42$ пМоль/л в группе CLP-перитонит + физ. р-р ($n = 10$) до $7,94 \pm 0,32$ пМоль/л в группе CLP-перитонит + $GdCl_3$ ($n = 10$).

Изменение уровней йодсодержащих гормонов щитовидной железы и их свободных фракций в плазме крови у крыс после CLP-перитонита в условиях действия в организме животных селективного ингибитора КК $GdCl_3$ представлено на рисунке 5.

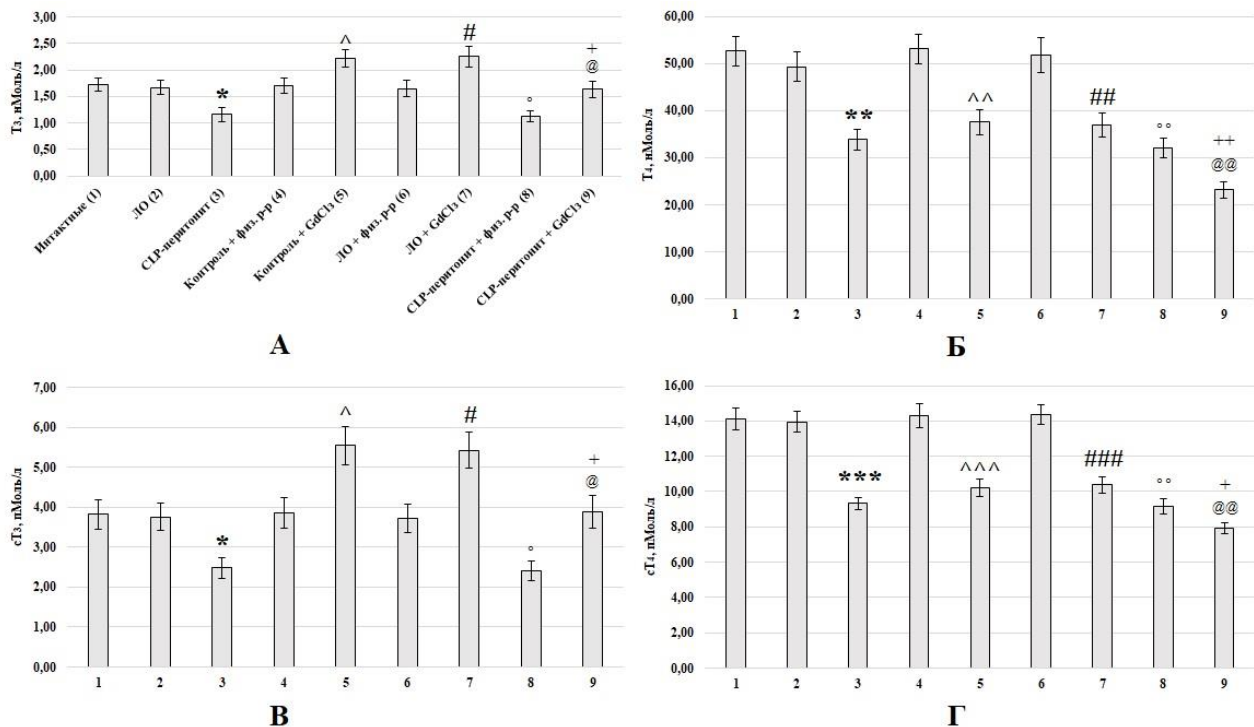


Рисунок 5. Уровни йодсодержащих гормонов щитовидной железы (А – T_3 , Б – T_4) и их свободных фракций (В – cT_3 , Г – cT_4) в плазме крови у крыс после CLP-перитонита в условиях действия в организме животных селективного ингибитора КК $GdCl_3$ (10 мг/кг). Примечание: * – $p < 0,05$ по отношению к группе ЛО, ** – $p < 0,01$ по отношению к группе ЛО, *** – $p < 0,001$ по отношению к группе ЛО, ^ – $p < 0,05$ по отношению к группе Контроль + физ. р-р, ^^ – $p < 0,01$ по отношению к группе Контроль + физ. р-р, ^^^ – $p < 0,001$ по отношению к группе Контроль + физ. р-р, # – $p < 0,05$ по отношению к группе ЛО + физ. р-р, ## – $p < 0,01$ по отношению к группе ЛО + физ. р-р, ### – $p < 0,001$ по отношению к группе ЛО + физ. р-р, ° – $p < 0,05$ по отношению к группе ЛО + физ. р-р, °° – $p < 0,001$ по отношению к группе ЛО + физ. р-р, @ – $p < 0,05$ по отношению к группе ЛО + $GdCl_3$, @@ – $p < 0,01$ по отношению к группе ЛО + $GdCl_3$, + – $p < 0,05$ по отношению к группе CLP-перитонит + физ. р-р, ++ – $p < 0,01$ по отношению к группе CLP-перитонит + физ. р-р

В группе Интактные животные ($n = 10$) содержание NOx в плазме крови и активность аргиназы печени составляли $12,87 \pm 1,32$ мкмоль/л и $5,64 \pm 0,37$ мкмоль мочевины/г сырой ткани $\times$ ч соответственно, а в группе ЛО ($n = 10$) $12,58 \pm 1,27$ мкмоль/л и $5,81 \pm 0,41$ мкмоль мочевины/г сырой ткани $\times$ ч соответственно. Развитие CLP-перитонита у крыс ($n = 10$) приводило, в сравнении с группой ЛО животных ($n = 10$), к повышению уровня NOx в плазме крови на 72,3 % ($p < 0,01$) и снижению активности аргиназы печени на 36,3 % ($p < 0,01$) и составили $21,67 \pm 1,86$ мкмоль/л и $3,70 \pm 0,21$ мкмоль мочевины/г сырой ткани $\times$ ч соответственно.

Применение $GdCl_3$ (в/б введение 1 раз в неделю на протяжении 8 недель с последующим выполнением CLP-операции после последнего введения препарата) приводило через 24 ч после CLP-операции к не столь выраженному повышению уровня NOx в крови. В группе животных CLP-перитонит + $GdCl_3$ ($n = 10$) в сравнении с группой CLP-перитонит + физ. р-р ($n = 10$) уровень NOx в плазме крови снижался на 29,2 % ($p < 0,05$) и составлял $15,84 \pm 1,45$ мкМоль/л, а активность аргиназы печени у крыс в данных условиях повышалась на 38,7 % ($p < 0,01$) и составляла $5,05 \pm 0,28$ мкМоль мочевины/г сырой ткани $\times$ ч.

Изменение активности аргиназы печени и уровня NOx в плазме крови у крыс с CLP-перитонитом в условиях действия в организме животных селективного ингибитора КК $GdCl_3$ представлено на рисунке 6.

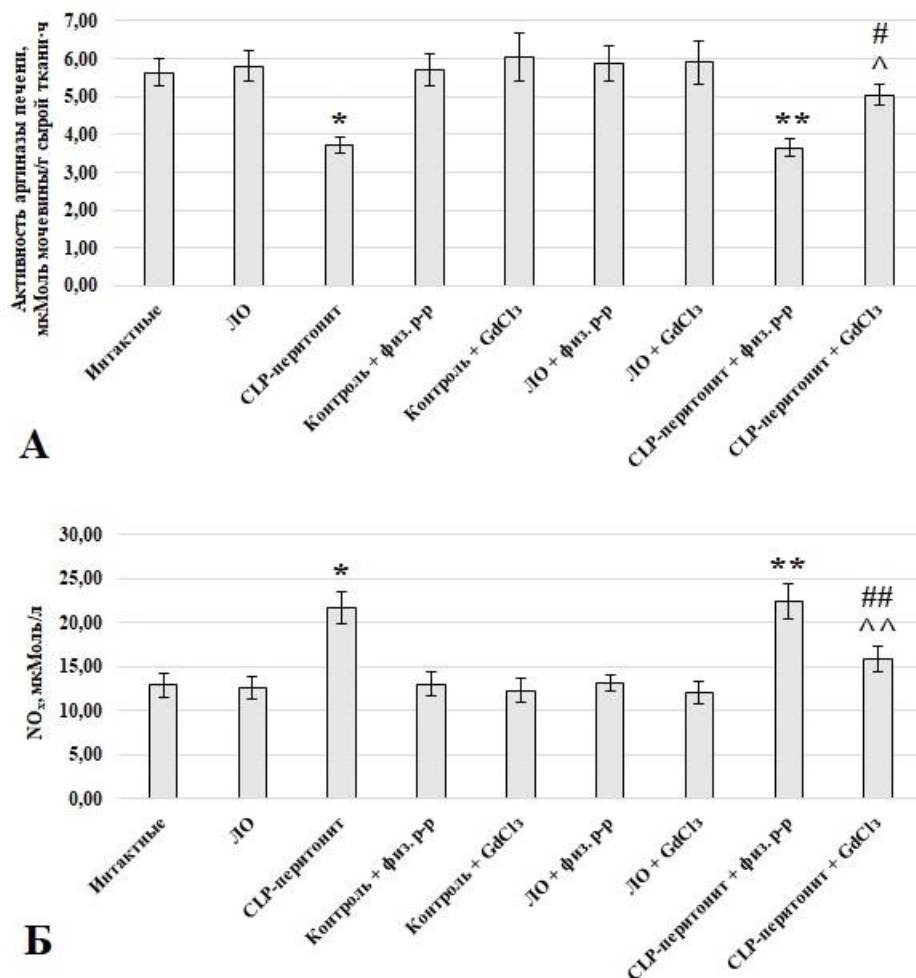


Рисунок 6. Активность аргиназы печени (А) и уровень NOx (Б) в плазме крови у крыс с CLP-перитонитом в условиях действия в организме животных селективного ингибитора КК $GdCl_3$ (10 мг/кг). Примечание: * – $p < 0,01$ по отношению к группе ЛО, ** – $p < 0,01$ по отношению к группе ЛО + физ. р-р, ^ – $p < 0,01$ по отношению к группе ЛО + $GdCl_3$, ^^ – $p < 0,001$ по отношению к группе ЛО + $GdCl_3$, # – $p < 0,01$ по отношению к группе CLP-перитонит + физ. р-р, ## – $p < 0,05$ по отношению к группе CLP-перитонит + физ. р-р

Опыты показали, что через 24 ч после CLP-операции имеет место угнетение детоксикационной функции печени, что проявлялось повышением СТК на 125,2 % ($p < 0,001$; $n = 10$), уровня СМ в плазме крови на 70,0 % ($p < 0,001$; $n = 10$) и увеличением ПНС на 43,4 % ($p < 0,05$; $n = 8$) по сравнению с ЛО животными.

В ходе исследования установлено, что ингибитор КК $GdCl_3$ в группе Контроль + $GdCl_3$ в сравнении с группой Контроль + физ. р-р приводил к статистически не значимому сокращению ПНС на 17,6 % ($p > 0,05$; $n = 8$) и не сопровождался статистически значимыми изменениями

таких показателей печеночной детоксикации как уровень СМ в плазме крови ($p > 0,05$; $n = 10$) и СТК ($p > 0,05$; $n = 10$). Содержание СМ в плазме крови, СТК и ПНС у крыс в группе Контроль + физ. р-р составили $0,737 \pm 0,018$ г/л, $1,34 \pm 0,12$ ед. и $29,34 \pm 2,78$ мин соответственно, а в группе Контроль + $GdCl_3$ – $0,718 \pm 0,018$ г/л, $1,27 \pm 0,12$ ед. и $24,18 \pm 2,10$ мин соответственно.

Развитие CLP-перитонита в условиях угнетения КК (в группе CLP-перитонит + $GdCl_3$) сопровождалось у крыс менее значимым снижением детоксикационной функции печени. Через 24 ч после CLP-операции в данных условиях были установлены следующие значения показателей детоксикационной функции печени: понижение СТК на 32,0 % ($p < 0,01$; $n = 10$), уровня СМ в плазме крови на 28,0 % ($p < 0,001$; $n = 10$) и снижение ПНС на 29,9 % ($p < 0,05$; $n = 8$) в сравнении с группой CLP-перитонит + физ. р-р.

Изменение содержания СМ в плазме крови, СТК и ПНС у крыс с CLP-перитонитом в условиях действия в организме животных ингибитора КК $GdCl_3$ представлено на рисунке 7.

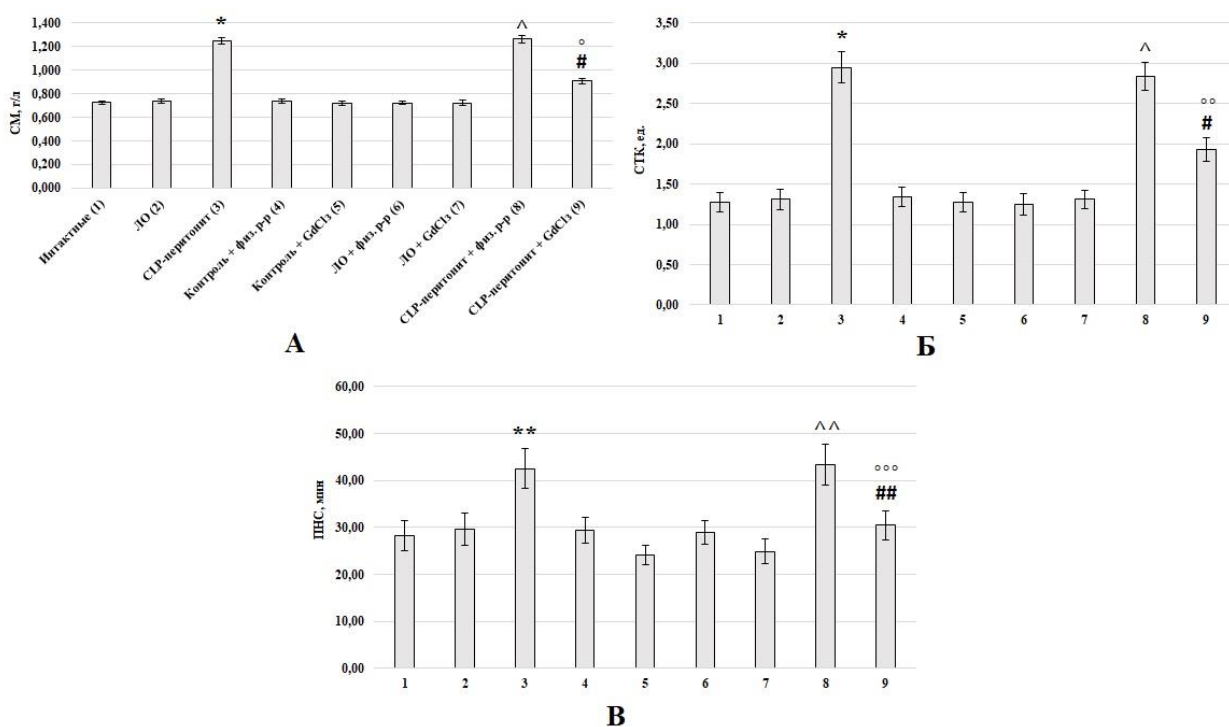


Рисунок 7. Содержания СМ в плазме крови (А), СТК (Б) и ПНС (В) у крыс после CLP-перитонита в условиях действия в организме животных ингибитора КК $GdCl_3$ (10 мг/кг). Примечание:

* – $p < 0,001$ по отношению к группе ЛО, ** – $p < 0,05$ по отношению к группе ЛО, ^ – $p < 0,001$ по отношению к группе ЛО + физ. р-р, ^^ – $p < 0,05$ по отношению к группе ЛО + физ. р-р, # – $p < 0,001$ по отношению к группе ЛО + $GdCl_3$, ## – $p < 0,05$ по отношению к группе ЛО + $GdCl_3$, ° – $p < 0,001$ по отношению к группе CLP-перитонит + физ. р-р, °° – $p < 0,01$ по отношению к группе CLP-перитонит + физ. р-р, °°° – $p < 0,05$ по отношению к группе CLP-перитонит + физ. р-р

Таким образом, результаты выполненного исследования дают основание заключить, что развитие CLP-перитонита в условиях действия в организме животных ингибитора КК $GdCl_3$ сопровождается более выраженными изменениями содержания общего ХС в печени и ЛП в сыворотке крови, уровня йодсодержащих гормонов щитовидной железы в плазме крови, угнетением детоксикационной функции печени и развитием вторичной дислипотеинемии.

Известно, что КК быстро активируются в ответ на бактериальный эндотоксин [31, 32, 39]. В процессе активации КК под действием бактерий или эндотоксина эти клетки проявляют высокую фагоцитарную активность и низкую способность секретировать медиаторы, воздействующие на клетки другой тканевой принадлежности в составе печени. Это состояние

КК позволяет противостоять возбудителю инфекции без повреждающих воздействий на другие ткани печени. Однако при более интенсивном активирующем воздействии эндотоксином КК переходят в «праймированное» состояние. В этом физиологическом состоянии их фагоцитарная активность снижается, а секреторная, напротив, стимулируется [36]. КК выделяют в синусоидальное пространство разнообразные по своей химической природе вещества (цитокины – ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6; производные жирных кислот – простагландины; ферменты – протеазы; а также АФК и АФА), которые могут не только повреждать гепатоциты, но и вызывать их гибель, действуя непосредственно на эти клетки [39–41].

Показано, что элиминация КК усиливает повреждение печени после частичной гепатэктомии. Этот факт свидетельствует о протекторной функции КК в упомянутых условиях [40, 42]. Имеются данные о том, что низкие концентрации цитокинов, высвобождаемые из КК, защищают гепатоциты от клеточной гибели и в некоторых случаях стимулируют их пролиферацию, в то время как высокие концентрации оказывают на гепатоциты повреждающее действие. В итоге продукция, не адекватная реакция КК на эндотоксин может стать не реакцией компенсации, а патологической [39].

Заключение. Развитие экспериментального перитонита (CLP-модель) у крыс через 24 ч сопровождается формированием гипотиреоидного состояния, вторичной атерогенной дислипидемии, снижением температуры тела, активности аргиназы и детоксикационной функции печени, а также повышением уровня NOx в плазме крови. У животных в этих условиях повышается активность АЛАТ и АсАТ в сыворотке крови, содержание общего ХС в печени и сыворотке крови, а также ХС ЛПОНП + ЛПНП в сыворотке крови и Ка, вместе с тем снижается содержание ХС ЛПВП в сыворотке крови, уровень йодсодержащих гормонов в плазме крови и соотношение активности АсАТ/АЛАТ. Установлено, что в выявленных изменениях активностей аргиназы, детоксикационной функции печени, тиреоидного статуса, содержания общего ХС в печени, ХС ЛП в сыворотке крови, уровня NOx в плазме крови и температуры тела у крыс с экспериментальным перитонитом имеет значение активность КК. Угнетение активности КК GdCl₃ ослабляет развитие атерогенной дислипидемии, восстанавливает сниженные уровни Т₃ и сТ₃, нормализует уровень NOx в плазме крови, активности аргиназы и детоксикационной функции печени и температуры тела после CLP-операции.

Литература:

- [1]. Marzougui Y., Missaoui K., Hannachi Z. et al. Peritonites post operatoires: facteurs pronostiques de mortalite [Postoperative peritonitis: pronostic factors of mortality] // Arch Inst Pasteur Tunis. 2014. Vol. 91, № 1–4. P. 67–76.
- [2]. Яковлев М.Ю. Системная эндотоксинемия // М.: Наука, 2021. 184 с.
- [3]. Nguyen-Lefebvre A.T., Horuzsko A. Kupffer cell metabolism and function // J Enzymol Metab. 2015. Vol. 1, № 1. Art. 101. P. 1–26.
- [4]. Karimi M.H., Geramizadeh B., Malek-Hosseini S.A. Tolerance Induction in Liver // Int J Organ Transplant Med. 2015. Vol. 6, № 2. P. 45–54.
- [5]. Lekkou A., Mouzaki A., Siagris D. et al. Serum lipid profile, cytokine production, and clinical outcome in patients with severe sepsis // Journal of Critical Care. 2014. Vol. 29, № 5. P. 723–727.
- [6]. Fan Y., Chen J., Liu D. et al. HDL-S1P protects endothelial function and reduces lung injury during sepsis in vivo and in vitro // The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 2020. Vol. 126. Art. 105819.
- [7]. Tanaka S., Diallo D., Delbosc S. et al. High-density lipoprotein (HDL) particle size and concentration changes in septic shock patients // Ann. Intensive Care. 2019. Vol. 9, № 1. Art. 68. P. 1–9.
- [8]. Гусаковская Э.В., Максимович Н.Е. Характеристика изменений в организме крыс с острым экспериментальным перитонитом // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. 2022. Т. 20, № 1. С. 91–97.
- [9]. Aminugata K., Pike D.P., Ford D.A. The lipid biology of sepsis // Journal of Lipid Research. 2021. Vol. 62. Art. 100090. P. 1–16.
- [10]. Чепелева Е.Н., Висмонт Ф.И. Клетки Купфера в регуляции содержания холестерина в печени и липопротеинах крови, уровня йодсодержащих гормонов щитовидной железы в крови и

- температуры тела у крыс с экспериментальным перитонитом // Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия медицинских наук. 2021. Т. 18, № 4. С. 391–401.
- [11]. Bermudes A.C.G., de Carvalho W.B., Zamberlan P. et al. Changes in lipid metabolism in pediatric patients with severe sepsis and septic shock // Nutrition. 2018. Vol. 47. P. 104–109.
- [12]. Barlage S., Gnewuch C., Liebisch G. et al. Changes in HDL-associated apolipoproteins relate to mortality in human sepsis and correlate to monocyte and platelet activation // Intensive Care Medicine. 2009. Vol. 35, No. 11. P. 1877–1885.
- [13]. Земко В.Ю., Окулич В.К., Дзядзько А.М. Роль клеток Купфера в развитии иммунного ответа при трансплантации печени // Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2021. № 2. С. 6–12.
- [14]. Yamada H., Umemoto T., Kawano M. et al. High-density lipoprotein and apolipoprotein A-I inhibit palmitate-induced translocation of toll-like receptor 4 into lipid rafts and inflammatory cytokines in 3T3-L1 adipocytes // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2017. Vol. 484. P. 403–408.
- [15]. Fan Y., Chen J., Liu D. et al. HDL-S1P protects endothelial function and reduces lung injury during sepsis in vivo and in vitro // Int. J. Biochem. Cell Biol. 2020. Vol. 126. Art. 105819.
- [16]. Tanaka S., Labreuche J., Drumez E. et al. Low HDL levels in sepsis versus trauma patients in intensive care unit // Ann. Intensive Care. 2017. Vol. 7. Art. 60. P. 1–8.
- [17]. Zhang X., Wang L., Chen B. Recombinant HDL (Milano) protects endotoxin-challenged rats from multiple organ injury and dysfunction // Biol. Chem. 2015. Vol. 396, № 1. P. 53–60.
- [18]. Barlage S., Gnewuch C., Liebisch G. et al. Changes in HDL-associated apolipoproteins relate to mortality in human sepsis and correlate to monocyte and platelet activation // Intensive Care Med. 2009. Vol. 35, № 11. P. 1877–1885.
- [19]. Артюшкевич С.А., Висмонт Ф.И. Роль йодсодержащих гормонов в регуляции детоксикационной функции печени и температуры тела при хронической этаноловой интоксикации // Медицина. 2008. № 8. С. 58–61.
- [20]. Sabatino L., Vassalle C., Del Seppia C. et al. Deiodinases and the three types of thyroid hormone deiodination reactions // Endocrinol Metab (Seoul). 2021. Vol. 36, № 5. – P. 952–964.
- [21]. Galton V.A., Hernandez A. Thyroid hormone metabolism: a historical perspective // Thyroid. 2023. Vol. 33, № 1. P. 24–31.
- [22]. McAninch E.A., Bianco A.C. Thyroid hormone signaling in energy homeostasis and energy metabolism // Ann N Y Acad Sci. 2014. Vol. 1311. P. 77–87.
- [23]. 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. URL: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32010L0063&qid=1660822800456&from=EN>. (date of access: 05.05.2025).
- [24]. Инструкция о порядке обращения с лабораторными животными // Национальный правовой Интернет-портал Республики Беларусь. – URL: https://minzdrav.gov.by/upload/lcfiles/постановление_МЗ_МЦХ_2024_164-124.pdf (дата обращения 05.05.2025).
- [25]. Шаповалова Е.Ю., Демяшкин Г.А., Маланичев М.Ю. и др. Моделирование экспериментального сепсиса путем выполнения лигирования и пункции слепой кишки (CLP-процедура) // Ульяновский медико-биологический журнал. 2020. № 3. С. 150–158.
- [26]. Capcha J.M.C., Moreira R.S., Rodrigues C.E. et al. Using the cecal ligation and puncture model of sepsis to induce rats to multiple organ dysfunction // Bio-protocol. 2021. Vol. 11, № 7. Art. e3979. P. 1–9.
- [27]. Burstein M., Samaille J. Sur la clarification du sérum lipémique par l'héparine in vitro // Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences (Paris). 1955. Vol. 241. № 9. P. 664–665.
- [28]. Крехова М.А., Чехранова М.К. Фракционное определение эфиров холестерина в крови и тканях с помощью хроматографии в тонком слое // Вопр. мед. химии. 1971. Т. 17, № 1. С. 93–98.
- [29]. Du S.S., Qiang M., Zeng Z.C. et al. Inactivation of Kupffer cells by gadolinium chloride protects murine liver from radiation-induced apoptosis // Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2010. Vol. 76, № 4. P. 1225–1234.
- [30]. Vollmar B., Rüttinger D., Wanner G.A. et al. Modulation of Kupffer cell activity by gadolinium chloride in endotoxemic rats // Shock. 1996. Vol. 6, № 6. P. 434–441.
- [31]. Sehic E., Hunter W.S., Ungar A.L. et al. Blockade of Kupffer cells prevents the febrile and preoptic prostaglandin E2 responses to intravenous lipopolysaccharide in guinea pigs // Annals of the New York Academy of Sciences. 1997. Vol. 813, № 1. P. 448–452.
- [32]. Vollmar B., Rettinger D., Wanner G.A. Modulation of Kupffer cells activity by gadolinium chloride in endotoxemic rats // Shock. 1996. Vol. 6, № 6. P. 434–441.

- [33]. Moshage H., Kok B., Huizenga J.R. et al. Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation // *Clinical Chemistry*. 1995. Vol. 41, № 6. P. 892–896.
- [34]. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике // 3-е изд. М. : МЕДпресс-информ. 2009. 896 с.
- [35]. Geyer J.W., Dabich D. Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates // *Anal. Biochem*. 1971. Vol. 39, № 2. P. 412–417.
- [36]. Моин В.М., Николайчик В.В., Курковский В.В. Способ определения веществ группы средних молекул в биологических жидкостях: а. с. 1520445 СССР, VRB F 01 № 33/50 // Открытия. Изобретения. Промышленные образцы. Товарные знаки. 1987. № 41. С. 415.
- [37]. Радькова О.А., Бояринов Г.А., Балишина И.Н. Способ определения токсичности биологических жидкостей: а. с. 1146570 СССР, МКИ 6 ОI № 1/28 // Открытия. Изобретения. Промышленные образцы. Товарные знаки. 1985. № 11. С. 616.
- [38]. Висмонт Ф.И., Артющкевич С.А. О роли клеток Купфера и гепатоцитов в механизмах реализации влияния трийодтиронина на процессы детоксикации и регуляции температуры тела // *Белорусский медицинский журнал*. 2005. Т. 13, № 3. С. 45–47.
- [39]. Элбакидзе Г.М. Механизмы протекторного действия активированных эндотоксином клеток Купфера на гепатоциты // *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2012. № 5. С. 48–54.
- [40]. Nguyen-Lefebvre A.T., Horuzsko A. Kupffer cell metabolism and function // *J Enzymol Metab*. 2015. Vol. 1, № 1. Art. 101. P. 1–26.
- [41]. Чепелева Е.Н., Висмонт Ф.И. О значимости активности аргиназы печени и клеток Купфера в развитии вторичной атерогенной дислипидемии и формировании тиреоидного статуса у крыс с экспериментальным перитонитом // *Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия медицинских наук*. 2023. Т. 20, № 1. С. 17–27.
- [42]. Tapia G., Santibanez C., Farias J. et al. Kupffer-cell activity is essential for thyroid hormone rat liver preconditioning // *Mol. Cell Endocrinol*. 2010. Vol. 323, № 2. P. 292–297.

E. N. CHEPELEVA, F. I. VISMONT

**ON THE PARTICIPATION OF KUPFFER CELLS IN DETOXIFICATION PROCESSES,
FORMATION OF THYROID STATUS AND DYSLIPIDEMIA IN RATS WITH EXPERIMENTAL
PERITONITIS**

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

Summary

Peritonitis, despite clinical successes, is still accompanied by high mortality due to developing sepsis and endotoxemia, and the mechanisms of peritonitis development remain not fully understood. Studies conducted over the past decade have shown that timely and high-quality purification of blood from endotoxins, correction of developing dyslipidemia largely depend on the functional state of the liver, its detoxification and endotoxin-neutralizing functions provided by hepatocytes and Kupffer cells (KC), whose participation in the mechanisms of maintaining homeostasis, regulating vital processes and forming protective and adaptive reactions in bacterial endotoxemia is obvious, however, clarification of the significance of these cells in regulating detoxification processes, forming thyroid status, and cholesterol metabolism of blood serum lipoproteins in septic conditions under conditions of experimental peritonitis has not been the subject of a special study.

The aim of the study was to determine the significance of KC activity in detoxification processes, formation of thyroid status and dyslipidemia in rats with experimental peritonitis (cecal ligation and puncture (CLP)-model).

Experiments on rats have shown that KC activity is significant in changes in arginase activity, liver detoxification function, thyroid status, total cholesterol in the liver, lipoprotein cholesterol in the blood serum, nitrite/nitrate levels in the blood plasma and body temperature in rats with experimental peritonitis. Inhibition of KC activity by GdCl₃ (10 mg/kg) weakens the development of atherogenic dyslipidemia, characteristic changes in triiodothyronine level and nitrite/nitrate content in the blood plasma, arginase activity and liver detoxification function and body temperature after CLP-surgery.

Keywords: peritonitis, Kupffer cells, dyslipidemia, thyroid status, detoxification, arginase, nitrites/nitrates, body temperature, rats.

Е. И. БОНЬ, Н. Е. МАКСИМОВИЧ, О. А. КАРНЮШКО, С. М. ЗИМАТКИН, А. А. НОВАК

ИЗМЕНЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ BCL-2 В ТЕМЕННОЙ КОРЕ И ГИППОКАМПЕ КРЫС ПРИ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ

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

Цель работы – изучить и проанализировать динамику изменения содержания белка Bcl-2 при различной степени тяжести ишемии у нескольких групп крыс. Моделировали ишемию головного мозга (ИГМ) различной степени тяжести (частичную, субтотальную и ступенчатую субтотальную) в условиях внутривенного тиопенталового наркоза (40–50 мг/кг). И с помощью иммуногистохимического метода с использованием моноклональных антител измеряли содержание Bcl-2 в цитоплазме пирамидных нейронов 5-го слоя теменной коры и поля СА₁ гиппокампа.

Ключевые слова: белок Bcl-2, ишемия, крысы, иммуногистохимический метод.

Введение. Патогенез ишемического повреждения головного мозга включает биохимический каскад, частью которого является активация апоптоза [4, 7]. Кроме патогенетической роли, апоптоз играет важную роль в процессе эмбрио- и органогенеза, а также инволюции органов и тканей в стареющем организме, иммунном ответе и других процессах.

Проявлениями апоптоза нейронов являются: набухание перикариона, деструкция нейропиля, конденсация хроматина, фрагментация ДНК с последующим кариорексисом.

Внешний (рецепторный) механизм апоптоза индуцируется внеклеточными стресс-сигналами, которые воспринимаются специфическими трансмембранными рецепторами.

Каспазозависимая клеточная гибель может подавляться ингибиторами широкого спектра, например, N-бензилоксикарбонил-Val-Ala-Asp-флуорометилкетонном.

Существует митохондриальный механизм усиления функции эффекторных каспаз. При этом каспаза-3 в активном состоянии расщепляет протеин цитоплазмы Bid, который затем перемещается к митохондрии и встраивается в мембрану, что приводит к освобождению цитохрома c из митохондрии в цитозоль. Цитохром c взаимодействует с Apoptotic protease activating factor 1 (APAF-1) и прокаспазой-9 с активацией последней и активацией прокаспазы-3, которая, в свою очередь, активирует каспазы-6 и 7 [1].

Причинами, запускающими апоптоз через изменение функции митохондрии, являются: дефицит факторов роста в окружающей клетку среде, увеличение образования в клетке активных форм кислорода, повреждение ДНК и др. [2].

Под влиянием этих стимулов изменяется функция протеинов, относящихся к семейству Bcl (B-Cell Leukemia/Lymphoma). Протеины этого семейства делятся на два класса.

Протеины первого класса семейства Bcl ингибируют апоптоз. Они погружены в наружную мембрану митохондрий и регулируют проницаемость мембраны, а также уменьшают образование активных форм кислорода. Представителями этого класса протеинов являются Bcl-2 и Bcl-x_L.

Белок Bcl-2 локализуется на внешней мембране митохондрий, ингибируя действия проапоптотических белков, которые обычно действуют на митохондриальную мембрану, способствуя повышению ее проницаемости и запуску апоптоза [10].

Протеины второго класса семейства Bcl стимулируют развитие апоптоза. Эти протеины находятся в цитозоле, но затем перемещаются к мембране митохондрий, где взаимодействуют с представителями первого класса – протеинами Bcl-2 и Bcl-x_L, ингибируя их. Членами протеинов второго класса семейства Bcl являются Bid, Bad, Bax и др.

Активация представителей второго класса Bcl вызывает повышение проницаемости внутренней мембраны митохондрий, что приводит к набуханию матрикса митохондрий и разрыву наружной мембраны [9]. При подавлении функции членов семейства Bcl-2, ингибирующих апоптоз, может образоваться «неселективный мегаканал» в мембране митохондрии, увеличивающий проницаемость мембраны, что приводит к освобождению цитохрома с и белка DIABLO из митохондрий в цитозоль.

Поступивший в цитозоль цитохром с взаимодействует с APAF-1, привлекая каспазу-9, что приводит к формированию комплекса протеинов – апоптосомы. В присутствии АТФ происходит активация каспазы-9. Протеин DIABLO инактивирует протеиновые ингибиторы апоптоза, что ведет к активации каспазы-3 [3].

Иницирующими факторами механизма с вовлечением внутреннего пути апоптоза являются внутриклеточные изменения, такие как повреждение ДНК, окислительный стресс, цитозольная кальциевая перегрузка, эксайтотоксичность (гиперстимуляция рецепторов глутамата), накопление денатурированных белков в эндоплазматической сети и другие [5]. Основным механизмом развития внутреннего пути апоптоза – увеличение проницаемости мембран митохондрий. Данный тип клеточной гибели может быть каспазозависимым или осуществляться независимо от каспаз [6].

Каспазозависимый путь клеточной смерти связан с лизисом хроматина и сопровождается истощением НАД⁺ и АТФ.

Согласно данным литературы, при церебральной ишемии, вызванной окклюзией средней мозговой артерии, в нейронах коры головного мозга снижается содержание белка Bcl-2 [10–12]. Вместе с тем, представляет интерес изучение изменения его содержания при церебральной ишемии различной степени тяжести [8].

Материалы и методы исследования. Эксперименты выполнены на 42 самцах беспородных белых крыс массой 260 ± 20 г с соблюдением требований Директивы Европейского Парламента и Совета № 2010/63/EU от 22.09.2010 о защите животных, используемых для научных целей.

Моделировали ишемию головного мозга (ИГМ) различной степени тяжести (частичную, субтотальную и ступенчатую субтотальную) в условиях внутривенного тиопенталового наркоза (40–50 мг/кг).

Частичную ишемию головного мозга (ЧИГМ) моделировали путем перевязки одной общей сонной артерии (ОСА) справа.

Субтотальную ишемию головного мозга (СИГМ) моделировали путем одновременной перевязки ОСА.

Ступенчатую субтотальную ИГМ (ССИГМ) осуществляли путем последовательной перевязки обеих ОСА с интервалом 7 суток (подгруппа 1), 3-е суток (подгруппа 2) и 1 сутки (подгруппа 3).

Взятие материала (участков теменной коры и гиппокампа) осуществляли через 1 час после операции.

Контрольную группу составили ложно оперированные крысы аналогичных пола и веса.

Определение содержания Bcl-2 в цитоплазме пирамидных нейронов 5-го слоя теменной коры и поля СА₁ гиппокампа крыс осуществляли иммуногистохимическим методом с использованием моноклональных антител. С этой целью после декапитации у крыс быстро извлекали головной мозг, кусочки коры больших полушарий головного мозга фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде при +4 °С (на ночь), затем заключали в парафин.

Парафиновые срезы толщиной 5 мкм готовили с помощью микротомы, монтировали на предметные стекла. Препараты обрабатывали согласно протоколу иммуноцитохимической реакции для световой микроскопии, исключаяющей процедуру теплового демаскирования антигенов. Для определения иммунореактивности молекулярного маркера Bcl-2 применяли первичные моноклональные мышинные антитела (Anti-Bcl-2 rabbit pAb antibody, Finetest, Китай, CatalogNo. FNab00839) в разведении 1 : 1600 при +4 °С, с экспозицией 20 ч во

влажной камере. Содержание белка Bcl-2 изучали в цитоплазме нейронов в иммуногистохимических препаратах на основе величины оптической плотности осадка хромогена с помощью микроскопа Axioscop 2 plus (Zeiss, Германия), цифровой видеокамеры (LeicaDFC 320, Германия) и программы анализа изображения ImageWarp (Bitflow, США).

Для предотвращения систематической ошибки измерений образцы головного мозга от сравниваемых контрольной и опытных групп животных изучали в одинаковых условиях.

В результате исследований получены количественные непрерывные данные. Так как в эксперименте использованы малые выборки, которые имели ненормальное распределение, анализ проводили методами непараметрической статистики с помощью лицензионной компьютерной программы Statistica 10.0 для Windows (StatSoft, Inc., США). Данные представлены в виде Me (LQ; UQ), где Me – медиана, LQ – значение нижнего квартиля; UQ – значение верхнего квартиля. Различия между группами считали достоверными при $p < 0,05$ (тест Крускал-Уоллиса с поправкой Бонферони).

Результаты и их обсуждение. У крыс с ЧИГМ изменений содержания Bcl-2 по отношению к уровню в контрольной группе ($p > 0,05$) не было выявлено (таблица 1, 2, рисунки 1, 2), что свидетельствует о сохранении нормальной регуляции апоптоза при данной виде ИГМ.

Таблица 1. Содержание Bcl-2 в цитоплазме пирамидных нейронов теменной коры головного мозга крыс с ишемией головного мозга, Me (LQ; UQ)

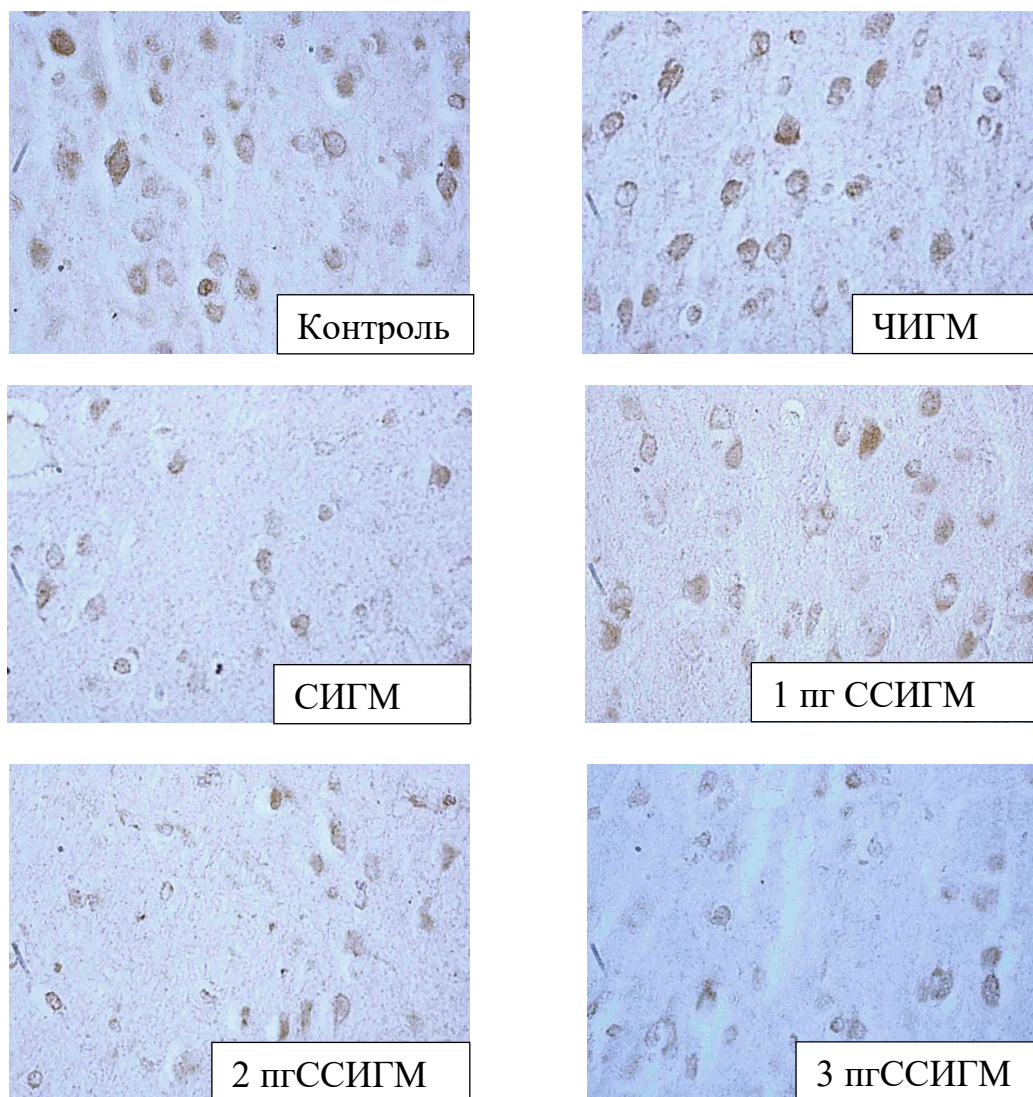
Контроль	ЧИГМ	СИГМ	ССИГМ		
			1 пг	2 пг	3 пг
0,25 (0,24; 0,26)	0,24 (0,22; 0,25)	0,16* (0,15; 0,16)	0,25 (0,24; 0,26)	0,16* (0,16; 0,16)	0,16* (0,15; 0,16)

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с группой «контроль»; ЧИГМ – частичная ишемия головного мозга; СИГМ – субтотальная ишемия головного мозга; ССИГМ – субтотальная ступенчатая ишемия головного мозга

Таблица 2. Содержание Bcl-2 в цитоплазме пирамидных нейронов поля СА₁ гиппокампа головного мозга крыс с ишемией головного мозга, Me (LQ; UQ)

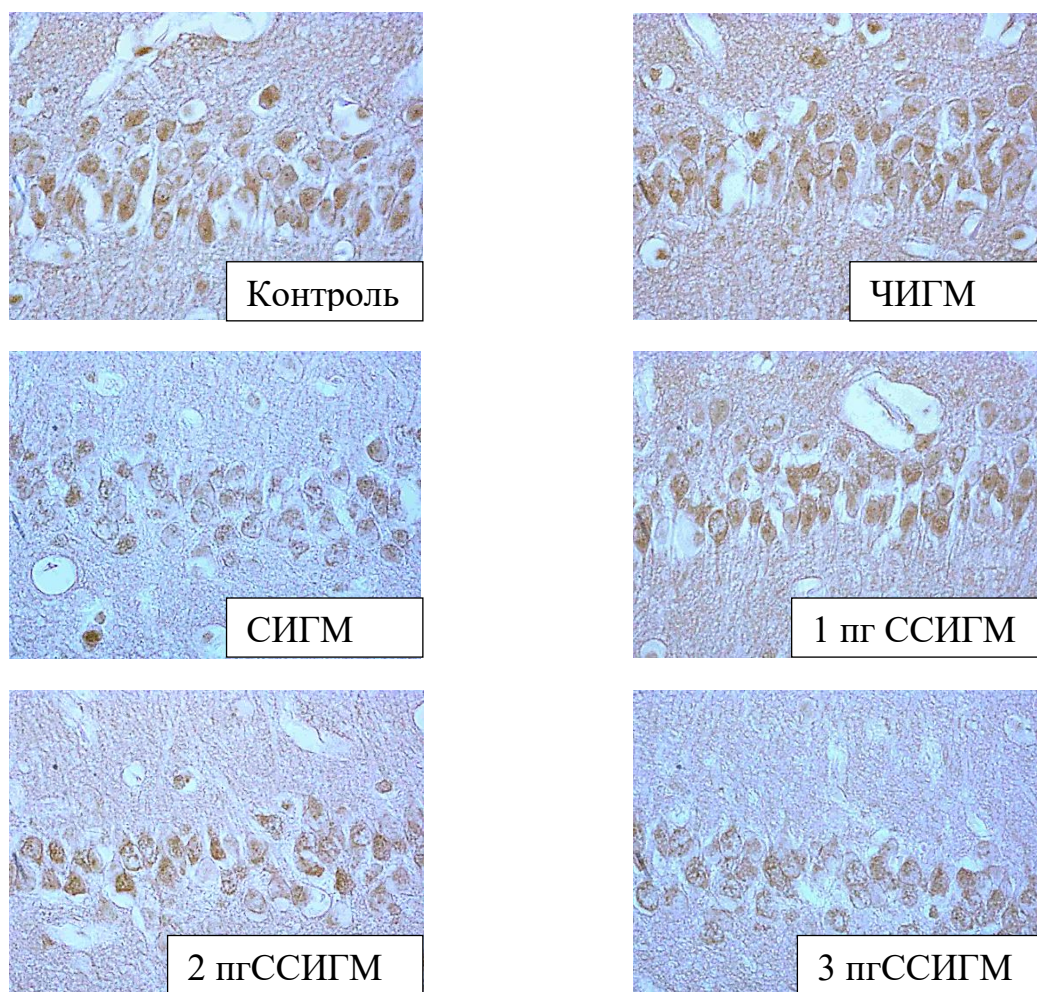
Контроль	ЧИГМ	СИГМ	ССИГМ		
			1 пг	2 пг	3 пг
0,22 (0,20; 0,23)	0,23 (0,22; 0,24)	0,16* (0,15; 0,16)	0,24 (0,23; 0,25)	0,16* (0,15; 0,16)	0,16* (0,16; 0,17)

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с группой «контроль»; ЧИГМ – частичная ишемия головного мозга; СИГМ – субтотальная ишемия головного мозга; ССИГМ – субтотальная ступенчатая ишемия головного мозга



Примечание: ЧИГМ – частичная ишемия головного мозга;
ССИГМ – ступенчатая субтотальная ишемия головного мозга;
СИГМ – субтотальная ишемия головного мозга

Рисунок 1. Содержание Vcl-2 (в единицах оптической плотности) в цитоплазме пирамидных нейронов теменной коры крыс с частичной (ЧИГМ), ступенчатой субтотальной (ССИГМ) и субтотальной (СИГМ) ишемией головного мозга. Цифровая микрофотография. Увеличение $\times 40$



Примечание: ЧИГМ – частичная ишемия головного мозга;
 ССИГМ – ступенчатая субтотальная ишемия головного мозга;
 СИГМ – субтотальная ишемия головного мозга

Рисунок 2. Содержание Bcl-2 (в единицах оптической плотности) в цитоплазме пирамидных нейронов поля СА₁ гиппокампа крыс с частичной (ЧИГМ), ступенчатой субтотальной (ССИГМ), субтотальной (СИГМ) и тотальной (ТИГМ) ишемией головного мозга. Цифровая микрофотография. Увеличение $\times 40$

При СИГМ, по сравнению с группой «контроль», содержание Bcl-2 уменьшилось – на 36 % в теменной коре ($p < 0,05$) и на 27 % в гиппокампе ($p < 0,05$), что может быть признаком нарушения блокировки апоптоза при более тяжелом виде ИГМ.

По сравнению с ЧИГМ, при СИГМ содержание Bcl-2 было меньше на 33% в теменной коре ($p < 0,05$) и на 30 % в гиппокампе ($p < 0,05$).

По сравнению с группой «контроль», в 1-й подгруппе ССИГМ с промежутком между перевязками ОСА 7 суток содержание Bcl-2 не изменялось ($p > 0,05$), а во 2-й и 3-й подгруппах ССИГМ (промежуток между перевязками 3 суток 1 сутки, соответственно), уменьшилось – на 36 % в теменной коре ($p < 0,05$) и на 27 % в гиппокампе ($p < 0,05$).

По сравнению с 1-й подгруппой ССИГМ, содержание Bcl-2 во 2-й и 3-й подгруппах ССИГМ уменьшилось на 36 % в теменной коре ($p < 0,05$) и на 33% в гиппокампе ($p < 0,05$). Между 2-й и 3-й подгруппах различий не было ($p > 0,05$).

Различий в содержании Bcl-2 в цитоплазме нейронов теменной коры и гиппокампа между 1-й подгруппой ССИГМ и ЧИГМ не было ($p > 0,05$), в то время как по сравнению с СИГМ, оно было меньше на 33 % как в теменной коре ($p < 0,05$) так и в гиппокампе ($p < 0,05$).

Таким образом, изменения содержания Bcl-2 в 1-й, 2-й и 3-й подгруппах ССИГМ были разнонаправленными: в 1-й подгруппе с максимальным интервалом между перевязками ОСА 7 суток, оно не изменялось, свидетельствуя о нормальной регуляции процессов апоптоза, в то время как во 2-й и 3-й подгруппах содержание Bcl-2 снижалось, что может указывать на отсутствие блокировки процессов гибели нейронов при более тяжелых формах ишемии головного мозга.

Заключение. Таким образом, наиболее значительные изменения содержания Bcl-2 произошли при субтотальной ишемии головного мозга продолжительностью 1 сутки, в то время как при частичной и ступенчатой субтотальной ишемии головного мозга с интервалом между перевязками обеих общих сонных артерий 7 суток содержание Bcl-2 не изменялось, по сравнению с показателями в группе «контроль». При ступенчатой субтотальной ишемии головного мозга с интервалом между перевязками обеих общих сонных артерий 1 и 3 сутки содержание Bcl-2 было сходным с таковым при одновременной перевязке обеих общих сонных артерий.

Литература:

- [1]. Беленичев И.Ф. Нейропротекция и нейропластичность: монография // «Полиграф плюс». 2014. 512 с.
- [2]. Бонь, Е.И., Максимович Н.Е. Способы моделирования и морфофункциональные маркеры ишемии головного мозга // Биомедицина. 2018. № 2. С. 59–71.
- [3]. Бонь, Е.И., Максимович Н.Е. Сравнительный анализ морфологических нарушений нейронов теменной коры и гиппокампа крыс при различных видах экспериментальной ишемии головного мозга // Оренбургский медицинский вестник. 2021. № 2. С. 29–36.
- [4]. Гусев Е.И., Скворцов В.И. Ишемия головного мозга // М: Медицина, 2001. 326 с.
- [5]. Коржевский Д.Э., Гилерович Е.Г., Кирик О.В. Иммуногистохимическое исследование головного мозга // Санкт-Петербург: СпецЛит. 2016. 143 с.
- [6]. Максимович Н.Е., Бонь Е.И., Зиматкин С.М. Головной мозг крысы и его реакция на ишемию: монография // Гродно: ГрГМУ. 2020. 240 с.
- [7]. Максимович Н.Е. Роль оксида азота в патогенезе ишемических и реперфузионных повреждений мозга: монография // Гродно: ГрГМУ, 2004. 178 с.
- [8]. Clemens J.A. Cerebral ischemia: gene activation, neuronal injury, and the protective role of antioxidants // Free Radic. Biol. Med. 2000. Vol. 28. P. 1526–1531.
- [9]. Dadgostar E. et al. Aquaporin 4 in Traumatic Brain Injury: From Molecular Pathways to Therapeutic Target // Neurochem. Res. 2022. P. 860–871.
- [10]. C. Hu, X. Chen, M. Wang, L. et al. Analgesic protects against cerebral ischemia-reperfusion through apoptosis inhibition and anti-neuroinflammation in rats // Neuropeptides. 2022. Art. 102230.
- [11]. Q. Hu, L. Luo, P. Yang et al. Neuroprotection of boropinol-B in cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting inflammation and apoptosis // Brain Res. Vol. 1798. Art. 148132.
- [12]. H. Wasan, D. Singh, B. Joshi et al. Dihydromyricetin alleviates cerebral ischemia-reperfusion injury by attenuating apoptosis and astrogliosis in peri-infarct cortex. Neurol. Res. 2022. Vol. 44. № 5. P. 403-414.

L. I. BON, N. YE. MAKSIMOVICH, O. A. KARNYUSHKO, S. M. ZIMATKIN, A. A. NOVAK

CHANGES IN BCL-2 CONTENT IN THE PARIETAL CORTEX AND HIPPOCAMPUS OF RATS WITH CEREBRAL ISCHEMIA OF VARYING SEVERITY

Educational Establishment “Grodno State Medical University”, Grodno, Republic of Belarus

Summary

The aim of the work was to study and analyze the dynamics of changes in the content of Bcl-2 protein with varying degrees of severity of ischemia in several groups of rats. Cerebral ischemia (IGM) of varying severity (partial, subtotal, and stepwise subtotal) was modeled under conditions of intravenous thiopental anesthesia (40–50 mg/kg). The content of Bcl-2 in the cytoplasm of pyramidal neurons of the 5th layer of the parietal cortex and the CA₁ field of the hippocampus was measured using an immunohistochemical method using monoclonal antibodies.

Keywords: Bcl-2 protein, ischemia, rats, immunohistochemical method.

Т. Е. КУЗНЕЦОВА, Ж. А. ГЛАДКОВА

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ПОЛОСАТОГО ТЕЛА КРЫС ПОСЛЕ КУРСОВОГО ИНТРАНАЗАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА *ESCHERICHIA COLI*

Государственное научное учреждение «Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси», г. Минск, Республики Беларусь

Проведено исследование влияния липополисахарида *Escherichia coli* (ЛПС *E. coli*; 0,1; 1; 10 мкг/кг) на частоту разрядов нейронов и морфометрические показатели полосатого тела после его 3-недельного ежедневного интраназального апплицирования.

Анализ полученных данных позволил выявить не только структурные и функциональные изменения нейродегенеративного характера в полосатом теле крыс Вистар, вызванных интраназальным апплицированием малых доз бактериального эндотоксина, но и зафиксировать их асимметрию

Ключевые слова: ЛПС *E. coli*, полосатое тело, спонтанная электрическая активность нейронов, морфометрический анализ.

Введение. В настоящее время наблюдается рост нейродегенеративных заболеваний. Болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и рассеянный склероз являются наиболее распространенными заболеваниями, поражающими миллионы людей во всем мире [1]. Заболевания данной группы характеризуются высокой социально-экономической значимостью, ростом числа случаев заболеваний с ранним началом, быстрым течением, прогрессирующей потерей нейрональной функции, что в конечном итоге приводит к двигательным и/или когнитивным нарушениям [2].

Эпидемиологические исследования показали наличие корреляции между хроническими микробными инфекциями и такими неврологическими расстройствами, как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и рассеянный склероз [3, 4]. Однако в связи со сложностью взаимодействий при микробных инфекциях, механизмы, лежащие в основе формирования нейровоспаления, остаются не до конца изученными [5].

Полученные экспериментальные данные по выявлению инфекционных агентов в тканях головного мозга пациентов с уже диагностированной патологией позволили выдвинуть и обосновать гипотезу о том, что именно микробная инфекция является одним из факторов риска развития нейродегенеративных заболеваний [6, 7]. Кроме того, было показано, что нейровоспаление является сложным многоуровневым механизмом, который обеспечивает компенсаторную реакцию нервной ткани на начальных этапах, однако в дальнейшем приводит к необратимой нейродегенерации и рассматривается учеными как центральный механизм, вызывающий повреждение нейронов при наличии микробных инфекций у пациента [8, 9].

Одной из наиболее изученных гипотез о причинах заболеваний, основанных на гибели нейронов, является предположение о том, что кишечные микробы влияют на мозг через ось «кишечник-мозг». Ось «кишечник-мозг» представляет собой двустороннюю функциональную связь между кишечником и головным мозгом, которая включает нейроэндокринные, нейронные, эндокринные и иммунные сигнальные пути [10]. Через вышеуказанные пути гамма-аминомасляная кислота, серотонин, норадреналин, гистамин и т. д. регулируют физиологические процессы в головном мозге в норме [11, 12]. Однако при изменении состава кишечного микробиома в сторону преобладания патологических бактерий наблюдается слабовыраженное воспаление, усиление окислительного стресса, нарушение энергетического обмена и усиление клеточной дегенерации [13, 14].

Бактериальный эндотоксин используется для изучения воздействия микробных агентов на головной мозг. В научных публикациях показано, что ЛПС *E. coli*, который в значительных количествах содержится в кишечнике может приводить к развитию нейродегенеративных заболеваний за счет активации микроглии [15, 16].

Экспериментальные модели по изучению воздействия чужеродных агентов на головной мозг, основанные на их введении через носовую полость, обоснованы тем, что вещества, вводимые интраназально, способны проникать в головной мозг, минуя гематоэнцефалический барьер [17–19].

Целью данного исследования являлось определение симметрии структурно-функциональных изменений в полосатом теле после длительного интраназального введения ЛПС *E. coli*.

Материалы и методы исследования. Все эксперименты проведены на белых крысах-самцах породы Вистар массой 280–320 г ($n = 40$). Интраназальное введение физиологического раствора натрия хлорида (0,9 %, Sigma-Aldrich, США) и ЛПС *E. coli* в дозе 0,1; 1; 10 мкг/кг (0111: B4; Sigma-Aldrich, США) производилось один раз в день в течение 21-х суток. Экспериментальные животные были разделены на четыре группы. Контрольной группе вводили физиологический раствор натрия хлорида (0,1 мл/кг; $n = 10$); группе 1 – ЛПС *E. coli* в дозе 0,1 мкг/кг ($n = 10$); группе 2 – ЛПС *E. coli* в дозе 1 мкг/кг ($n = 10$); группе 3 – ЛПС *E. coli* в дозе 10 мкг/кг ($n = 10$). Животных содержали в стандартных условиях вивария (температура воздуха 23 ± 1 °С, режим вентиляции 30 мин/ч) при свободном доступе к воде и пище, на одинаковом рационе питания в соответствии со стандартами содержания лабораторных животных, 12/12-часовом ритме света и темноты, с соблюдением режима тишины.

Острые эксперименты проводили на наркотизированных животных (нембутал и уретан в пропорции 30 мг/кг и 500 мг/кг внутривенно; Sigma-Aldrich, США). У крыс под наркозом удаляли шерсть с дорсальной поверхности головы, рассекали мягкие ткани свода черепа, удаляли надкостницу. Голову крыс фиксировали в стереотаксическом устройстве СЭЖ-5 (Конструктор, Украина) таким образом, чтобы краниальные ориентиры лямбда и брегма располагались строго в горизонтальной плоскости. С помощью микродрели (Sae Yang Microtech, Южная Корея) в костях черепа просверливали отверстие диаметром 1 мм в соответствии со стереотаксическими координатами полосатого тела: 0,72 мм каудальнее брегмы, 2,8 мм латеральнее средней линии и 3,5 мм вентрально относительно поверхности черепа [20]. Далее вскрывали твердую мозговую оболочку и через трепанационное отверстие в ткань мозга с помощью микроманипулятора медленно погружали электрод (WPI, США).

Полученные данные записывали и обрабатывали с помощью программы регистрации электрофизиологических данных «InputWin» (Институт физиологии, Беларусь).

Для проведения морфометрического анализа ткань мозга извлекали в течение 3 минут после декапитации. Последующее криосрезирование (Microm GmbH, Германия) проводили при температуре -20 °С для получения 10-мкм срезов для анализа нейрональных и глиальных клеток (модифицированная окраска по Нисслю). Криосрезы высушивали на воздухе в течение 2–3 мин, фиксировали, дегидратировали в этаноле и окрашивали толуидиновым синим в течение 10 минут (Биовитрум, Россия) [21]. Препараты мозга также окрашивали гематоксилином и эозином. Срезы исследовали с помощью светового микроскопа LUM-1, оснащенного цифровой камерой (Альтами, Россия). Морфометрию гистологических препаратов проводили при увеличении $\times 400$ в 10 полях зрения на одно животное. Морфометрия выполнялась автоматически с помощью программы ImageJ 1.52a (National Institutes of Health, USA).

Все эксперименты проведены с учетом рекомендаций Европейской конвенции о гуманном обращении с лабораторными животными [22].

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с использованием табличного процессора Microsoft Excel (Microsoft Office 2021; Microsoft, США), статистической программы «Statistica 10» (StatSoft, США). Нормальность распределения

значений проверяли с помощью W-критерия Шапиро–Уилка. Статистическую значимость полученных результатов в случае нормального распределения оценивали с помощью t-критерия Стьюдента для зависимых/независимых выборок и представляли в виде среднего значения и стандартного отклонения ($M \pm SD$). Для интерпретации данных в случае отклонения распределения от нормального использовали медиану (Me) и интерквартильный размах – 25 и 75 процентиля [LQ; UQ], для сравнения зависимых выборок использовали критерий Вилкоксона, для независимых – U-критерий Манна-Уитни. При анализе полученных данных использовали номинальный уровень статистической значимости ($p < 0,05$).

Результаты и их обсуждение. Установлено, что интраназальное введение физиологического раствора не сопровождается изменениями нейронов в исследуемых зонах мозга: преобладали нормохромные клетки симметричной формы с равномерно распределенным тигроидным веществом и ядрами округлой формы с крупными ядрышками, расположенными обычно в центре ядра; в небольшом количестве визуализировали гиперхромные и гипохромные нейроны (рисунок 1).

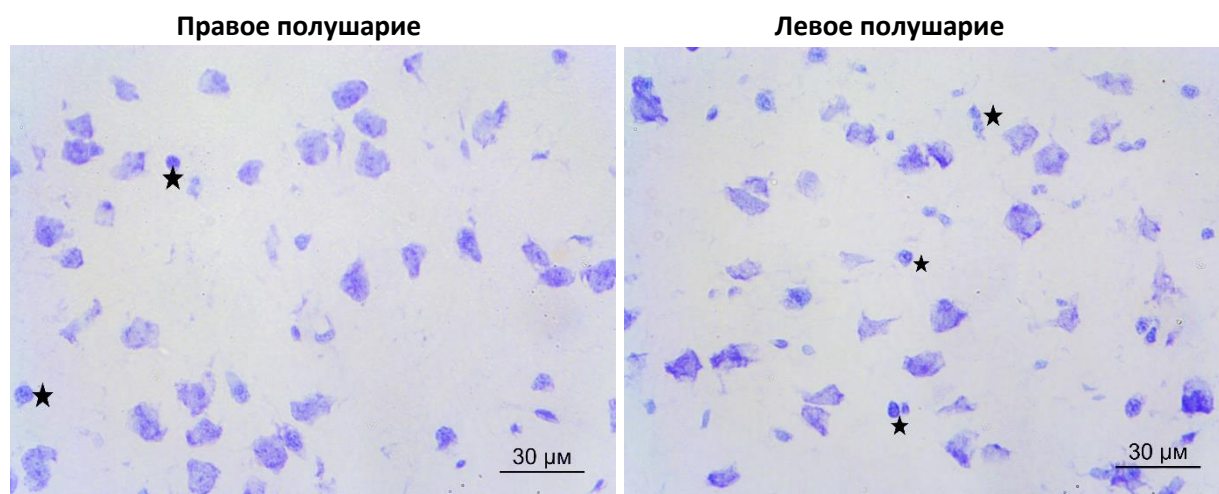


Рисунок 1. Гистоструктура полосатого тела (справа, слева) контрольной группы крыс Вистар, окрашенная по Нисслю. Увеличение: $\times 400$. Звездочки – глиальные клетки. Масштабная линейка = 30 мкм

При проведении морфометрического исследования полосатого тела обоих полушарий мозга крыс у интактных животных не обнаружили выраженной структурной асимметрии (таблица 1).

Таблица 1. Данные морфометрического исследования полосатого тела после ежедневного введения физиологического раствора (0,01 мл/кг) или ЛПС *E. coli* в дозе 0,1; 1; 10 мкг/кг в течение 21-х суток.

	правое полушарие			
	контроль	0,1 мкг/кг	1 мкг/кг	10 мкг/кг
количество нейронов, n	27 $\pm$ 6	31 $\pm$ 5 *	29 $\pm$ 8	27 $\pm$ 7
средний размер нейронов, мкм ²	79 $\pm$ 10	77 $\pm$ 8	76 $\pm$ 7	73 $\pm$ 8 *
количество нейронов с деструктивными изменениями, %	3	6 *	14 *	17 *
количество глиальных клеток, n	15 $\pm$ 3	17 $\pm$ 4 *	16 $\pm$ 5	19 $\pm$ 5 *
электрическая активность нейронов, имп/с	2,8 [1,8;3,4]	2,2 [1,6;6,4]	3,6 [2,4;5,6]	2,3 [1,4;3,1]

Окончание таблицы 1.

	левое полушарие			
количество нейронов, п	25 ± 7	32 ± 7 *	32 ± 7 *	25 ± 8
средний размер нейронов, мкм ²	78 ± 12	67 ± 7 *,**	68 ± 6 *,**	73 ± 6 *
количество нейронов с деструктивными изменениями, %	2	4 *,**	9 *,**	13 *
количество глиальных клеток, п	15 ± 4	19 ± 5 *	16 ± 4	17 ± 7
электрическая активность нейронов, имп/с	2,6 [1,4;4,3]	2,2 [1,4;3,2] **	3,0 [2,0;3,6] **	4,6 [2,7;5,7] **

Примечание: данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение; * $p < 0,05$ – статистически значимые различия между группами ЛПС *E. coli* и контроля; ** $p < 0,05$ – статистически значимые различия между правым и левым полушарием.

После интраназального введения ЛПС *E. coli* в дозе 0,1 мкг/кг выявили увеличение числа нейронов в поле зрения в полосатом теле правого и левого полушарий; размеры нейронов были достоверно меньше в левом полушарии, справа не различались; число нейронов с признаками деструкции также увеличивалось справа и слева; визуализировали гипохромные нейроны, теневые клетки и нейроны с вакуолизацией цитоплазмы; число нервных клеток с деструкцией справа было достоверно больше, чем слева; число глии в поле зрения достоверно увеличивалось справа и слева, следует отметить, слева увеличение было более выражено (таблица 1, рисунок 2).

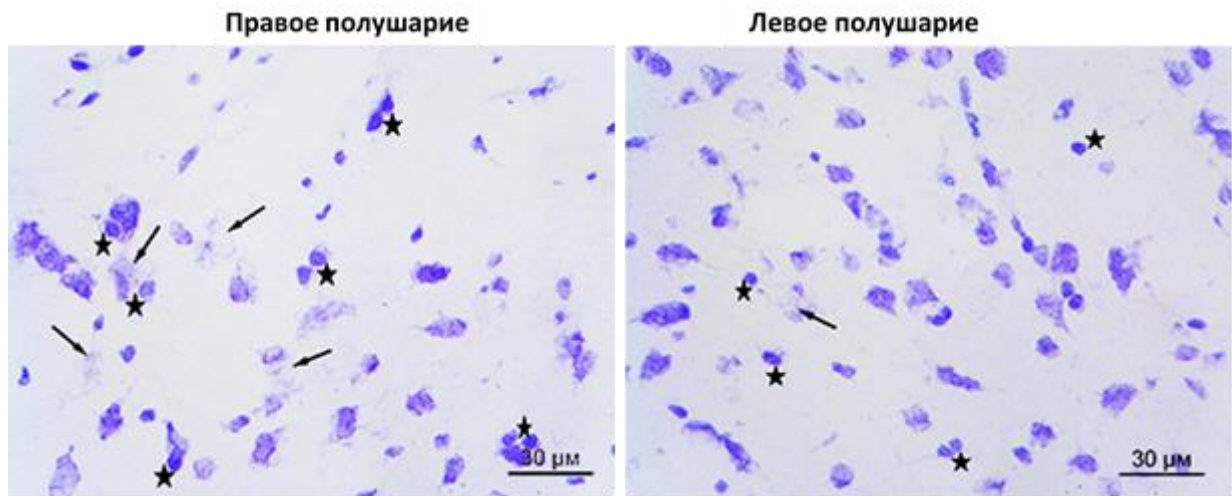


Рисунок 2. Гистоструктура полосатого тела (правое и левое полушарие) крыс Вистар после интраназального применения ЛПС *E. coli* в дозе 0,1 мкг/кг, окрашенного по Нисслю. Увеличение: ×400. Стрелками обозначены нейроны с аномальной морфологией, звездочками – глиальные клетки. Масштабная линейка = 30 мкм

После введения ЛПС *E. coli* в дозе 1 мкг/кг число нейронов в поле зрения увеличивалось, а их размеры уменьшались в левом полушарии; число нейронов с деструктивными изменениями увеличивалось с обеих сторон; количество глиоцитов с обеих сторон не отличалось от контрольных показателей (таблица 1, рисунок 3).

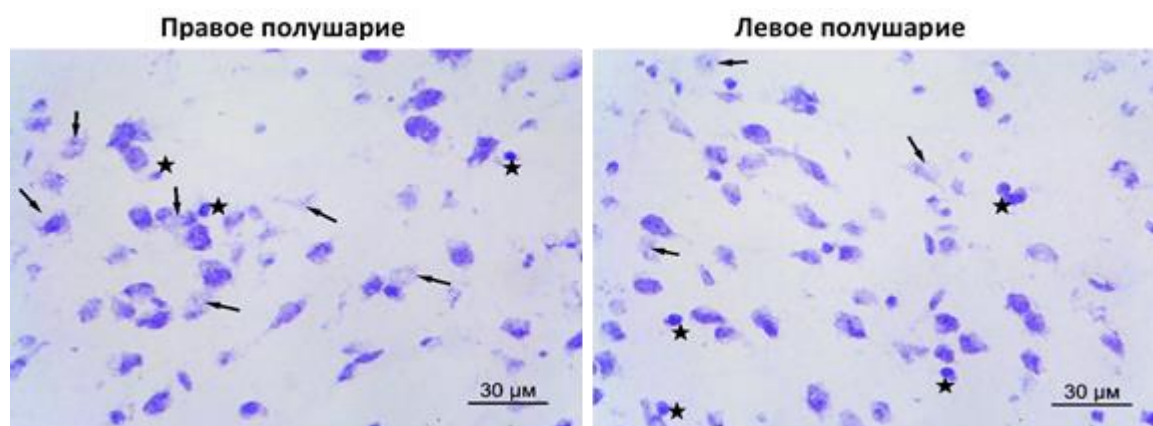


Рисунок 3. Гистоструктура полосатого тела (правое и левое полушарие) крыс Вистар после интраназального применения ЛПС *E. coli* в дозе 1 мкг/кг, окрашенных по Нисслю. Увеличение: $\times 400$. Стрелками обозначены нейроны с аномальной морфологией, звездочками – глиальные клетки. Масштабная линейка = 30 мкм

После введения ЛПС *E. coli* в дозе 10 мкг/кг количество нейронов в поле зрения с обеих сторон не отличалось от контроля, однако их размеры были существенно меньше; количество нейронов с деструктивными изменениями симметрично возрастало, отметили, что справа их было значительно больше; количество глиии увеличилось только с правой стороны (таблица 1, рисунок 4).

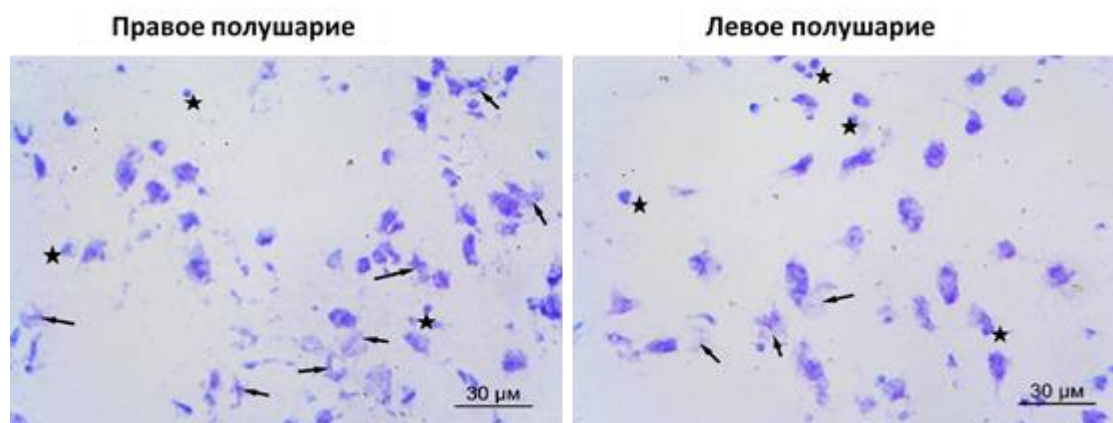


Рисунок 4. Гистоструктура полосатого тела (правое и левое полушарие) крыс Вистар после интраназального применения ЛПС *E. coli* в дозе 10 мкг/кг, окрашенных по Нисслю. Увеличение: $\times 400$. Стрелками обозначены нейроны с аномальной морфологией, звездочками – глиальные клетки. Масштабная линейка = 30 мкм

Количество нервных клеток с деструкцией справа было существенно больше, чем слева; среднее количество глиии в поле зрения справа и слева также увеличивалось с преобладанием в левом полушарии (рисунок 4, таблица 1).

В полосатом теле крыс после интраназального введения ЛПС *E. coli* в дозе 10 мкг/кг выявили нарушения микроциркуляции капилляров, артериол и венул во всех полях зрения: венозные сосуды были расширены, имели тонкие стенки, избыточное кровенаполнение, иногда в них наблюдался диapedез эритроцитов; ширина межэндотелиальных пространств в интима увеличивалась, что создавало предпосылки для развития периваскулярного отека; капиллярное русло имело неравномерное кровенаполнение с чередованием полнокровных расширенных и узких щелевидных малокровных сосудов (рисунок 5).

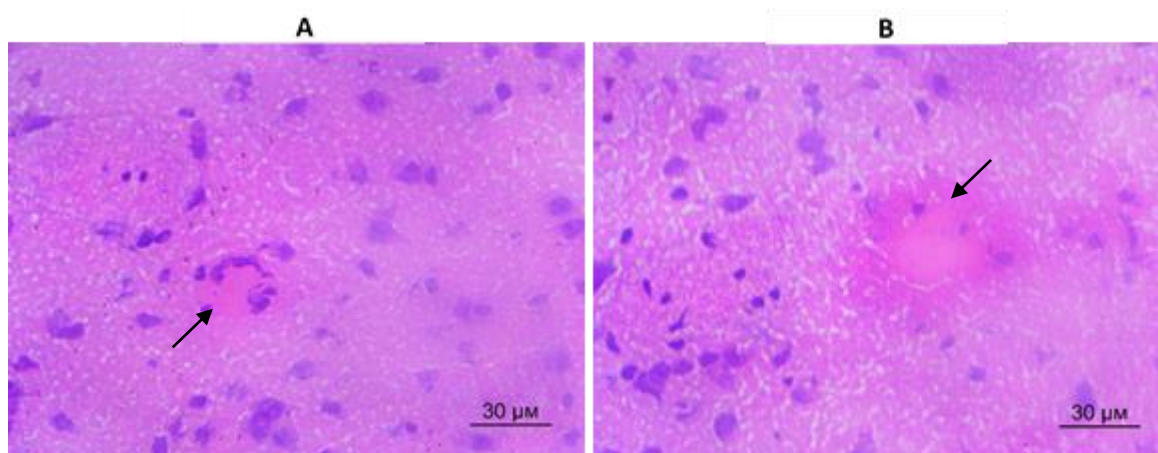


Рисунок 5. Микроциркуляция полосатого тела: артериола (А) и венула (В) крыс Вистар после интраназальной аппликации ЛПС *E. coli* в дозе 10 мкг/кг. Окраска: гематоксилин и эозин. Увеличение: $\times 400$. Масштабная линейка = 30 мкм.

После введения бактериального эндотоксина в максимальной дозе наиболее выраженные изменения зафиксировали в артериолах: в интиме эндотелий подвергался очаговой десквамации с обнажением субэндотелиального слоя, в остальных участках с сохраненным эндотелием наблюдалось увеличение объема ядросодержащих частей эндотелиоцитов, в мышечной оболочке наблюдались неравномерно выраженная гипертрофия и явления отека, что способствовало повышению ее проницаемости и формированию периваскулярного отека (рисунок 5).

У крыс с меньшими дозами вводимого ЛПС *E. coli* сосудистая реакция была выражена слабее: только единичные артериолы имели аномалии эндотелиальной выстилки; венулы и капилляры сохраняли нормальную структуру.

Установлено, что интраназальное введение физиологического раствора натрия хлорида в дозе 0,01 мкг/кг не оказывало влияние на электрическую активность нейронов в исследуемых областях мозга (таблица 1). При сравнении показателей электрической активности нейронов полосатого тела правого и левого полушарий после интраназального введения ЛПС *E. coli* в дозах 0,1; 1 и 10 мкг/кг не выявили изменений по отношению к контрольной группе (таблица 1). В то время, как при анализе показателей функционирования нейронов левого и правого полушарий после интраназального введения ЛПС *E. coli* в дозе 0,1 мкг/кг и 1 мкг/кг в левом полушарии зарегистрировали снижение частоты разрядов нейронов и усиление импульсной активности после введения бактериального эндотоксина в дозе 10 мкг/кг (таблица 1).

Заключение. Интраназальное введение ЛПС *E. coli* приводит к дозозависимому ассиметричному увеличению количества глиальных клеток, количества нейронов с измененной структурой, что свидетельствует о наличии нейровоспаления, нейродеструкции. Количество нейронов достоверно увеличивалось с обеих сторон при введении бактериального эндотоксина в дозе 0,1 мкг/кг, слева – только при дозе 1 мкг/кг. Уменьшение размеров нейронов слева определялось после введения всех трех доз, справа – при дозе 10 мкг/кг. Наблюдалось увеличение количества нейронов с признаками деструкции в обоих полушариях после введения трех доз бактериального эндотоксина. Количество глиальных клеток справа увеличивалось после введения доз 0,1 мкг/кг и 10 мкг/кг, а слева – только при дозе 0,1 мкг/кг. При изучении импульсной активности нейронов после интраназального введения ЛПС *E. coli* в дозе 0,1 мкг/кг и 1 мкг/кг в левом полушарии выявили снижение частоты разрядов нейронов и ее повышение после введения бактериального эндотоксина в дозе 10 мкг/кг.

Полученные данные свидетельствуют о том, что нейродегенеративные изменения происходят неравномерно и морфологические изменения в полосатом теле не соответствуют изменениям электрической активности нейронов.

Разработка новых методов диагностики, основанных не только на магнитно-резонансной томографии, создание новых тестов, учитывающих особенности работы правого и левого полушарий, позволит не только выявлять изменения на более ранних стадиях, но и заблаговременно начинать их лечение.

Литература:

- [1]. DeTure M., Dickson D. The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease // *Mol. Neurodegener.* 2019. Vol. 14, № 32. P. 1–18.
- [2]. Osburg B., Peiser C., Domling D. et al. Effect of endotoxin on expression of TNF receptors and transport of TNF-alpha at the blood-brain barrier of the rat // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2002. Vol. 283, № 5. P. 899–908.
- [3]. McFarland H., Martin R. Multiple sclerosis: A complicated picture of autoimmunity // *Nat. Immunol.* 2007. Vol. 8. P. 913–919.
- [4]. Gabrielli M., Bonazzi P., Scarpellini E. et al. Prevalence of small intestinal bacterial overgrowth in parkinson's disease // *Mov. Disord.* 2011. Vol. 26. P. 889–892.
- [5]. Aisen P., Cummings J., Jr J. et al. On the path to 2025: understanding the Alzheimer's disease continuum // *Alzheimers Res. Ther.* 2017. Vol. 9, № 60. P. 1–10.
- [6]. Sonninen T., Hamalainen R., Koskivi M. et al. Metabolic alterations in Parkinson's disease astrocytes // *Sci Rep.* 2020. Vol. 10, № 14474. P. 1–14.
- [7]. Kwon H., Koh S. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes // *Transl. Neurodegener.* 2020. Vol. 9, № 42. P. 1–12.
- [8]. Saji N., Niida S., Murotani K. et al. Analysis of the relationship between the gut microbiome and dementia: a cross-sectional study conducted in Japan // *Sci Rep.* 2019. Vol. 9, № 1: P. 1–5.
- [9]. Wang H., Liu X., Tan C. et al. Bacterial, viral, and fungal infection-related risk of Parkinson's disease: Meta-analysis of cohort and case-control studies // *Brain Behav.* 2020. Vol. 10, № 3. P. 1–14.
- [10]. Noble E.; Hsu T.; Kanoski S. Gut to Brain Dysbiosis: Mechanisms Linking Western Diet Consumption, the Microbiome, and Cognitive Impairment // *Front. Behav. Neurosci.* 2017. Vol. 11, № 9. P. 1–10.
- [11]. Kennedy P.; Cryan J.; Dinan T. et al. Kynurenine pathway metabolism and the microbiota-gut-brain axis // *Neuropharmacology.* 2017. Vol. 112. P. 399–412.
- [12]. Rowland I.; Gibson G.; Heinken A. et al. Gut microbiota functions: Metabolism of nutrients and other food components // *Eur. J. Nutr.* 2018. Vol. 57, № 1. P. 1–24.
- [13]. O'Toole P., Claesson M. Gut microbiota: Changes throughout the lifespan from infancy to elderly // *International Dairy Journal.* 2010. Vol. 20, № 4. P. 281–291.
- [14]. Mulak A., Bonaz B. Brain-gut-microbiota axis in Parkinson's disease // *World J. Gastroenterol.* 2015. Vol. 21, № 37. P. 10609–10620.
- [15]. Erridge C., Bennett-Guerrero E., Poxton I. Structure and function of lipopolysaccharides // *Microb. Infect.* 2002. Vol. 4, № 8, P. 837–851.
- [16]. Tran V., Kang Y., Kim H-K. et al. Oral pathogenic bacteria-inducing neurodegenerative microgliosis in human neural cell platform // *Int J. Mol Sci.* 2021. Vol. 22, № 6925. P. 1–17.
- [17]. Smith T., Siegel M., Bonar C. et al. The existence of the vomeronasal organ in postnatal chimpanzees and evidence for its homology with that of humans // *J. Anat.* 2001. Vol. 198, № 1. P. 77–82.
- [18]. Hunter R.L., Cheng B., Choi D.-Y. et al. Intrastriatal lipopolysaccharide injection induces parkinsonism in C57/B6 mice // *J. Neurosci Res.* 2009. Vol. 87, № 8. P. 1913–1921.
- [19]. Boyko A.V., Hladkova, Z.A., Kuznetsova T.E. et al. Modeling of parkinsonism syndrome in rats by the administration of lipopolysaccharide // *Journal of the Grodno State Medical University.* 2018. Vol. 16, № 6. P. 690–696.
- [20]. Paxinos Y., Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, 1998, 256 p.
- [21]. Xie L., Rong J., Li Q. A Novel Method for Constructing Histological Section Datasets of the Basal Ganglia in Digitized Human Brain // *Anat. Rec. (Hoboken).* 2017. Vol. 300, № 6, P. 1011–1021.
- [22]. European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes centry // *Europ. Treaty Series.* 1986. Vol. 123. P. 248–249.

T. E. KUZNETSOVA, Z. A. HLADKOVA

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL FEATURES OF THE RAT STRIATUM AFTER LONG-TERM INTRANASAL ADMINISTRATION OF *ESCHERICHIA COLI* LIPOPOLYSACCHARIDE

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

Summary

The effects of *Escherichia coli* lipopolysaccharide (*E. coli* LPS; 0,1; 1; 10 µg/kg) on the frequency of neuronal discharges and morphometric indices of the striatum were studied after its 3-week daily intranasal application.

The analysis of the obtained data allowed us to identify not only structural and functional changes of a neurodegenerative nature in the striatum of Wistar rats caused by intranasal application of small doses of bacterial endotoxin, but also to record their asymmetry.

Keywords: *E. coli* LPS, striatum, spontaneous electrical activity of neurons, morphometric analysis.

Н. И. НЕЧИПУРЕНКО¹, Т. Е. КУЗНЕЦОВА², Е. А. КОРОТКЕВИЧ¹, И. Д. ПАШКОВСКАЯ¹,
Э. Ш. РАХМОНОВ¹, Н. А. ТРУШЕЛЬ³, Н. А. ЮЗЕФОВИЧ³

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ СЕДАЛИЩНОГО НЕРВА ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ КОМПРЕССИОННО-ИШЕМИЧЕСКОЙ НЕВРОПАТИИ В УСЛОВИЯХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ТРАНСПЛАНТАТА АМНИОТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ

¹ Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр неврологии и
нейрохирургии», г. Минск, Республика Беларусь

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

³ Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,
г. Минск, Республика Беларусь

Разработана верифицированная модель компрессионно-ишемической невропатии (КИН) седалищного нерва в эксперименте на кроликах. Установлены характерные морфологические нарушения в срезах центрального, проксимального и дистального участков компримированного седалищного нерва через 1, 2, 4-6 недель и 3,5 мес после моделирования КИН. Результаты морфологических изменений спустя 3,5 мес после моделирования КИН седалищного нерва и последующего окутывания его ксенографтом амниотической мембраны плода человека продемонстрировали практически полное восстановление гистологической структуры нерва без развития фиброза. В контрольной группе в этом же сроке сохранялись дегенеративные изменения в части пучков седалищного нерва.

Ключевые слова: компрессионно-ишемическая невропатия, седалищный нерв, верификация модели, морфология, трансплантат амниотической мембраны.

Введение. Медикаментозное и хирургическое лечение компрессионно-ишемических нейропатий (КИН), возникающих в результате сдавления нервов конечностей за последние десятилетия не отмечено значительными успехами. В определенной мере это можно связать с ограниченными представлениями клиницистов о сложном патогенезе развития КИН, а также с отсутствием прорывных лечебных методик. В связи с этим нами изучены морфологические проявления дозированного сдавления седалищного нерва кроликов и регенеративные процессы в условиях его окутывания (тубулизации) консервированным трансплантатом амниотической оболочки плода человека, полученной при оперативном родоразрешении женщин путем кесарева сечения. После выполнения экспериментальных исследований мы применили аллотрансплантат амниотической мембраны (ААМ) у 40 пациентов во время декомпрессивных нейрохирургических вмешательствах при туннельных синдромах запястного и локтевого каналов. В процессе анализа результатов собственных экспериментальных исследований мы учитывали разноречивые и несистематизированные данные зарубежных авторов, а также разные мнения авторитетных исследователей о целесообразности применения ААМ в нейрохирургической практике [1–10].

Туннельные КИН в зависимости от тяжести и продолжительности сдавления нервного ствола проявляются различной степенью аксонотмезиса (2–4 степень травмы нерва по Sunderland): от локальной демиелинизации до разрыва аксонов и их периневральных оболочек. Близкую к клиническому развитию КИН авторы моделировали раздавливанием седалищного нерва, при котором происходило повреждение аксонов, миелиновой и шванновской оболочек с сохранением эпинеурия и анатомической непрерывности нервного ствола [11–15]. Однако стандартизированный и воспроизводимый метод раздавливания нерва

не был предложен. Фокальное внешнее воздействие вызывает в нерве механические и сосудистые нарушения, а также воспалительную реакцию, которая повышает местную проницаемость сосудов с развитием внутриневрального отека [16–18]. Секретирующие цитокины активируют пролиферацию интактных шванновских клеток, которые синтезируют новый внеклеточный матрикс и формируют колонку из полос Бюнгнера для обеспечения направленного роста аксонов к органам-мишеням. В шванновских клетках продуцируются фактор роста нервов и нейротрофические факторы, способствующие росту и дифференцированию новых аксонов. Однако повышение активности макрофагов и фибробластов уже в течение 3–6 недель способствует образованию внутриствольных рубцов и спаек нерва с окружающими тканями. Возникающие кровоизлияния в нерве с развитием в нем фиброзной ткани способствуют формированию невром [19–23]. Поэтому хирургическая декомпрессия нервных стволов с удалением неконтролируемого образования коллагеновых рубцов часто не обеспечивает ожидаемый эффект операции.

Образование спаек между нервом и окружающими тканями, вызывающих помехи для регенерации нервных волокон, мотивировало нейрохирургов и травматологов к выполнению операций окутывания нервов биологическими и искусственными материалами. Рядом авторов показано, что использование ААМ после компрессионных повреждений нервов способны препятствовать рубцеванию и улучшить регенерацию аксонов. Продукты из амниотической мембраны уменьшали рубцовый процесс за счет гиалуроновой кислоты (находящейся на поверхности мезенхимы), также снижалась активация фибробластов. Интерлейкин 10 эпителиальных клеток подавлял экспрессию провоспалительных цитокинов и антигенов, тем самым уменьшая воспалительные реакции. Укутывание нерва ААМ предотвращало инвазию макрофагов, что улучшало нервную проводимость [1, 4, 7, 10, 23].

Для окутывания травмированных нервов с целью профилактики рубцово-спаечного процесса в операционной ране мы использовали антигенно инактивированный консервированный ААМ плода человека. Амниотическая мембрана – это прозрачная аваскулярная плодная оболочка, развивающаяся из фетальной эктодермы и состоящая из слоя эпителиальных клеток, расположенных на основной мембране, и соединительнотканной строме. Толщина ее от 0,02 до 0,5 мм, она является самой внутренней из трех оболочек плода и включает пять слоев: амниотический эпителий, базальную мембрану, компактный слой, слой фибробластов, спонгиозный слой. Предоставляло ААМ государственное учреждение «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии», отделение «Тканевые биотрансплантаты». Забор материала производился в стерильных условиях операционной после родоразрешения женщин путем кесарева сечения.

Исходя из вышеизложенного сформулирована цель исследования – изучить характер морфологических изменений при моделировании КИН седалищного нерва у кроликов при использовании трансплантата (ксенографта) амниотической мембраны (АМ).

Материалы и методы исследования. Экспериментальные исследования проведены на 28 половозрелых беспородных кроликах обоего пола массой 3,5 – 4,4 кг, содержащихся в одинаковых условиях вивария БГМУ в стандартных клетках на обычном пищевом рационе при смешанном типе кормления в соответствии с нормативами индивидуального размещения. Исследования выполняли в соответствии с этическими нормами обращения с лабораторными животными, требованиями Директив Совета Европейского союза, Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных или иных научных целях ETS № 123 от 18.03.1986 и ТКП 125 – 2008 «Надлежащая лабораторная практика, утвержденная постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь № 56 от 28.03.2008. Хирургическое вмешательство проводилось под внутривенным тиопентал–натриевым наркозом (90–100 мг/кг).

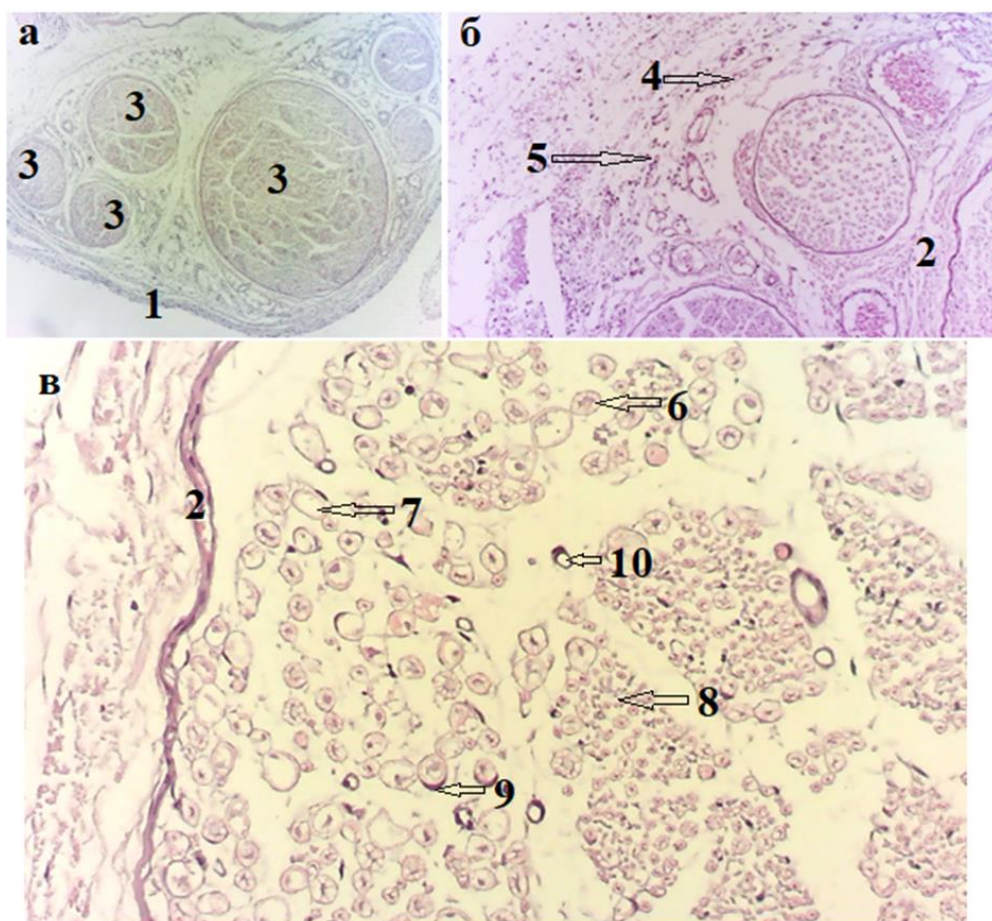
После рассечения кожи и широкой фасции бедра первую головку двуглавой, приводящие и полусухожильную мышцы тупо расслаивали и отводили наружу. Проводили дозированную компрессию седалищного нерва животного в течение 30 мин. После снятия

зажима у 10 кроликов 1-й опытной и 5 животных 2-й опытной групп по периметру измененного компрессией участка нерва накладывали консервированный ксенографт АМ плода человека. У 10 животных 1-й контрольной и 3-х животных 2-й контрольной групп осуществляли только компрессию седалищного нерва. Рану послойно зашивали. Спустя 1, 2 и 4–6 недель у кроликов 1-й опытной и контрольной групп, а у животных 2-й опытной и 2-й контрольной групп через 3,5 мес визуально оценивали состояние всех участков нерва, которые затем извлекали для морфологических исследований. Эвтаназию кроликов проводили путем передозировки внутривенного введения тиопентал-натрия.

Проводку материала осуществляли в лаборатории клинической патогистологии УЗ «Минский клинический консультативно-диагностический центр» и центре морфологических исследований ГНУ «Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси». Материал оценивали визуально, фиксировали его цвет и размеры, после чего вырезали фрагменты в отдельные биопсийные кассеты. После проводки биологического материала его заливался в парафин, резали на микротоме Leica RM 2125RT и выполняли поперечные и продольные срезы толщиной 2,5–4 мкм, от 2 до 6–8 срезов на стекле. Готовые стекла окрашивали гематоксилином-эозином и по Ван-Гизону. В готовых гистологических препаратах оценивали состояние нервных стволов и волокон, эндоневрия, перинервия, эпинервия и прилежащих тканей.

Результаты и их обсуждение. Для выполнения экспериментального моделирования КИН седалищного нерва кролика разработано унифицированное устройство, позволяющее дозировать и контролировать механическое повреждение нерва. Проведен расчёт поперечного механического напряжения, возникающего в нерве в результате поперечной деформации, и сравнение этого напряжения с прочностными характеристиками ткани нерва [24, 25]. Помощь в создании данного устройства и расчёт поперечного механического напряжения, возникающего в нерве в результате поперечной деформации, а также сравнение этого напряжения с прочностными характеристиками ткани нерва была оказана кандидатом технических наук, доцентом кафедры медицинской и биологической физики БГМУ Мансуровым В.А. Показано, что суммарная величина силы, действующей на сжимающие плоскости устройства для компрессии, составляет около 1,7 Н [24–26]. Численное моделирование напряженно-деформированного состояния показало, что наиболее вероятное повреждение ткани нерва происходит по границе контакта в узкой клиновидной области, что подтверждается результатами гистологических исследований.

В качестве примера на рисунке 1 представлено микроскопическое исследование седалищного нерва кролика контрольной группы через 1 неделю в месте компрессии при малом увеличении, где отмечалось очаговое утолщение эпиневрия и волокнистой части периневрия. Эпителиоидная часть последнего извилистая, с участками расслоения (рисунок 1а).



1 – эпиневрй, 2 – периневрй, 3 – пучки нервных волокон, 4 – неоангиогенез, 5 – лейкоцитарная инфильтрация, 6 – интактное нервное волокно, 7 – дегенерация нервного волокна, 8 – мелкие нервные волокна, 9 – ядро нейролеммоцита, 10 – утолщение стенки капилляра

Рисунок 1. Место компрессии седалищного нерва через 1 неделю после компрессии: а – окраска гематоксилин-эозин, увеличение 4×, б – окраска гематоксилин-эозин, увеличение 10×, в – окраска гематоксилин-эозин, увеличение 40×

В соединительной ткани эпиневрия при большом увеличении отмечались явления неоангиогенеза, расширение и полнокровие сосудов, очаговая лейкоцитарная инфильтрация (рисунок 1б). В нервных пучках были явления отека (увеличение пространства между соседними нервными волокнами), эндоневрий интактен (рисунок 1в). В пучках нервных волокон определялись явления дегенеративных изменений различной степени, вплоть до полного разрушения. При большом увеличении нервные волокна в пучках располагались менее компактно, выявлен полиморфизм изменений нервных волокон практически во всех пучках. При сохранности некоторой части нервных волокон, большинство их с выраженными признаками дегенерации. Эндоневрий сохранен.

После дозированного сдавления нервов и послойного ушивания раны животные содержались в клетках индивидуально под наблюдением персонала вивария и ветеринарного врача. При визуальной оценке состояния животных оценивали объем движений в задних конечностях. К концу 2-й недели у всех животных 1-й контрольной группы сохранялась слабость в конечностях при попытке стояния на задних лапах и отсутствовало разведение пальцев оперированной конечности. К концу 4-й недели 60 % кроликов этой же группы свободно передвигались по клетке и опирались на задние лапы. При ревизии раны у 50 % кроликов отмечалось наличие выраженного спаечного процесса между подлежащими мягкими тканями и нерва, у остальных животных эти изменения были менее выражены. В течение 2-х недель после моделирования КИН в области компрессии наблюдался отек участка

седалищного нерва и наличие следов кровоизлияний. При морфологическом исследовании седалищного нерва кроликов 1-й контрольной группы через 2 недели после компрессии нерва реализуются последовательно сменяющие друг друга стадии демиелинизации, дегенерации и регенерации нервных волокон. К 4-й неделе после компрессии нерва отмечалось очаговое разрастание и уплотнение соединительной ткани эпинеурия и перинеурия. Значительная часть аксонов регенерировала и находилась в стадии ремиелинизации.

При морфологическом исследовании седалищного нерва кроликов 1-й опытной группы через 2 недели после компрессии нерва и окутывания его ксенографтом АМ отмечалось выраженное разрастание соединительной ткани в эпинеурии и менее выраженное в межпучковых пространствах, преимущественно в участках, прилежащих к ксенографту. В соединительной ткани вокруг ксенографта выявлена выраженная эозинофильная и лимфоидная инфильтрация с формированием лимфоидных узелков, что свидетельствует, вероятнее всего, о развитии воспалительной реакции, обусловленной иммунологической несовместимостью ксенографта АМ человека с нервной тканью кролика.

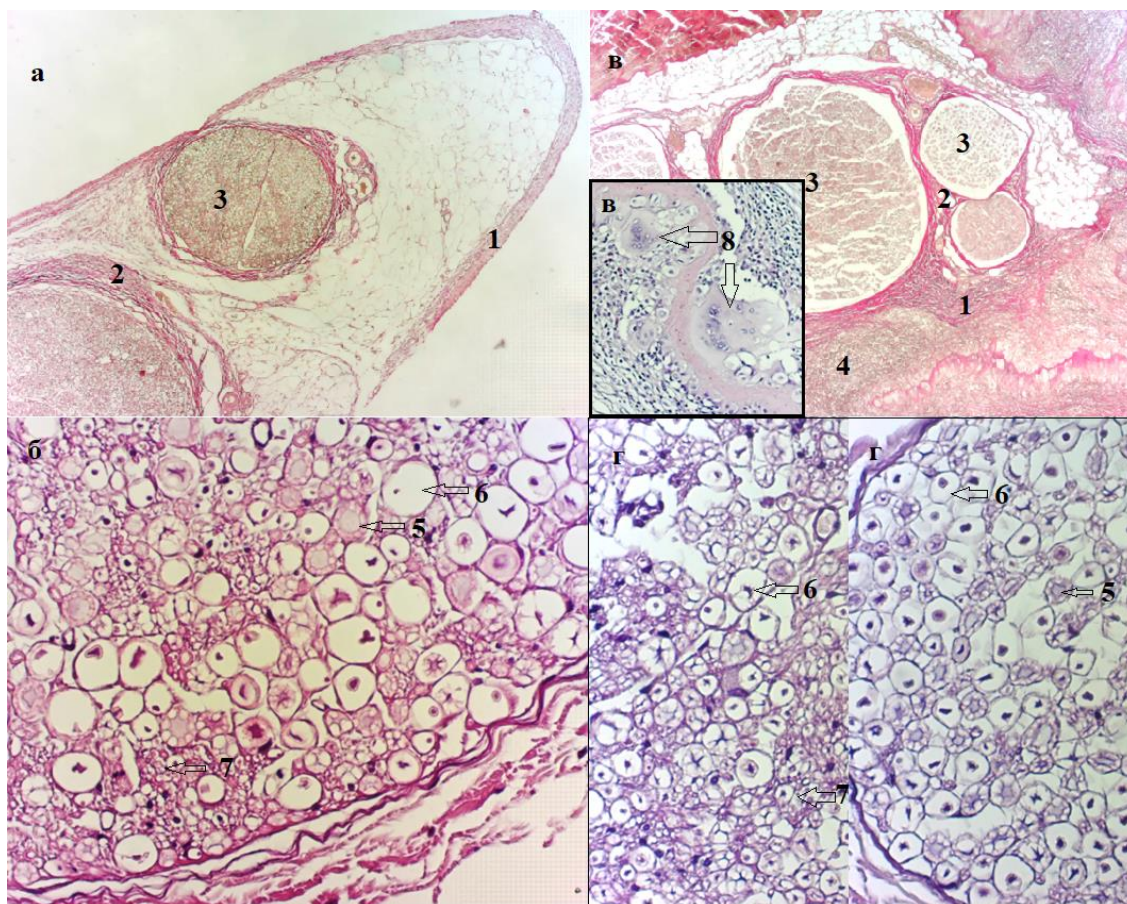
Через 4 недели после компрессии и окутывания нерва ксенографтом АМ в соединительной ткани сохранялись выраженная эозинофильная и лимфоидная инфильтрация с формированием лимфоидных узелков вокруг ксенографта, разрастание соединительной ткани в эпинеурии и межпучковых пространствах. В то же время наряду с процессами демиелинизации и дегенеративными изменениями отмечалось присутствие большого количества мелких регенерирующих нервных волокон на дистальном участке седалищного нерва. Внутри пучков между нервными волокнами отмечалось незначительное диффузное разрастание соединительной ткани.

Через 6 недель после компрессии нерва и наложения ксенографта АМ в прилежащих к нему участках сохранялась лимфоидная инфильтрация соединительной ткани с образованием узелков, но была менее выражена эозинофильная инфильтрация. Также внутри пучков наблюдалась мозаичность морфологических изменений нервных волокон с преобладанием мелких регенерирующих. По сравнению с предыдущим периодом внутри пучков отмечалось очаговое разрастание соединительной ткани [27].

Морфологические изменения нервных волокон в пучках в зоне компрессии и наложения ксенографта АМ варьируют как в разных пучках, так и в различных участках одного пучка: наряду с процессами демиелинизации и дегенеративными изменениями отмечается присутствие большого количества мелких регенерирующих нервных волокон и интактных. Внутри пучков между нервными волокнами в ряде образцов отмечаются диффузные и очаговые незначительно выраженные разрастания соединительной ткани (рисунок 2).

На гистологических препаратах седалищного нерва кролика в прилежащих к ксенографту АМ участках сохраняется лимфоидная инфильтрация соединительной ткани с образованием фолликулов, менее выражена эозинофильная инфильтрация. На участках, граничащих с ксенографтом, выявляются крупные многоядерные клетки (гигантские макрофаги).

Внутри пучков наблюдается мозаичность морфологических изменений нервных волокон: наряду с преобладающими мелкими регенерирующими и относительно интактными, встречается небольшое количество дегенерирующих нервных волокон с сохраненными эндоневральными футлярами. Выявлены диффузные очаговые разрастания соединительной ткани внутри пучков.



1 – эпиневррий, 2 – периневррий, 3 – пучки нервных волокон, 4 – лимфоидный фолликул, 5 – интактные нервные волокна, 6 – дегенерирующие нервные волокна, 7 – мелкие нервные волокна

Рисунок 2. а, б – место компрессии седалищного нерва через 4 недели после компрессии, в, г – место компрессии через 4 недели после компрессии и наложения ксенографта. а, в – окраска Ван-Гизон, увеличение 4×, б, г – окраска гематоксилин-эозин, увеличение 40×

Выше места пережатия через 4 недели после операции на продольных и косых срезах нерва большинство нервных волокон сохранено. Сосуды периневррия и эпиневррия местами экстазированы и полнокровны. Отмечались незначительные образования соединительной ткани в области эпиневррия и между пучками нервных волокон. Соединительная ткань между нервными волокнами внутри пучка также выражена незначительно. В пучках выявлена мозаичность изменений нервных волокон: на фоне небольшого количества дегенеративно измененных, присутствует обилие мелких и интактных нервных волокон. Степень выраженности этих изменений варьирует в разных пучках, не отличаясь от изменений в проксимальных фрагментах седалищного нерва в 1-й контрольной группе.

Дистальнее места компрессии на препаратах поперечных и косых срезов нерва с эпиневрием и прилежащей тканью нервные волокна практически интактны, местами с явлениями пролиферации. В прилежащей ткани имелись очаги склероза. Сосуды периневррия и эпиневррия экстазированы и местами полнокровны. Показана умеренная степень выраженности соединительной ткани.

Через 3,5 месяца после компрессии седалищного нерва кроликов 2-й контрольной группы проксимальнее области компрессии нерв имел нормальное строение (рисунок 3 А). Отек периневральный и эндоневральный не определялся. Большинство нервных волокон были интактными, некоторые волокна были деструктивно изменены – в них отсутствовали осевые цилиндры (рисунок 3 Б). Признаков фиброза не выявлено, эпинервий и перинервий нормальной толщины (рисунок 3 В).

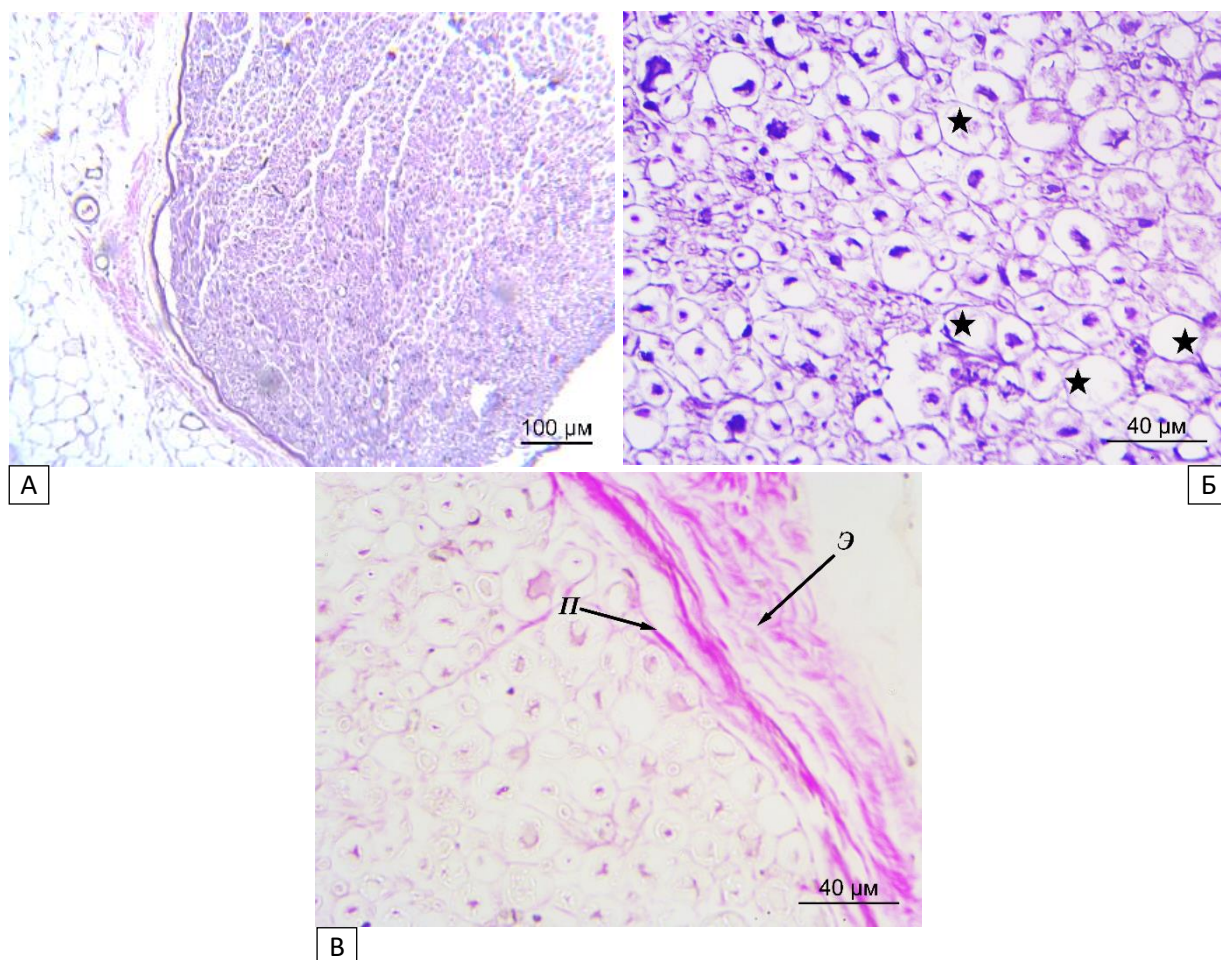


Рисунок 3. Проксимальный отдел седалищного нерва кролика контрольной группы через 3,5 месяца после компрессии. Звездочки – деструктивно измененные волокна, Э – эпинервий, П – перинервий. Окраска: гематоксилин-эозин (А, Б), по Ван-Гизону (В). Увеличение: 100× (А), 400× (Б, В)

В области компрессии седалищного нерва (центральный отдел) через 3,5 месяца часть пучков была дегенеративно изменена (рисунок 4 А). В них присутствовал выраженный воспалительный инфильтрат (рисунок 4 Б). Нервные волокна практически отсутствовали, на их месте наблюдали прорастание соединительно-тканых волокон (рисунок 4 В). Разрастание эпинервия и перинервия наблюдали лишь вокруг пучков с деструкцией.

Ниже области компрессии (дистальный отдел) также часть пучков седалищного нерва имела признаки деструктивных изменений (рисунок 5 А). Местами наблюдали расслоение нервных волокон, их дегенеративные изменения (рисунок 5 Б). Эпинервий и перинервий не утолщены (рисунок 5 В).

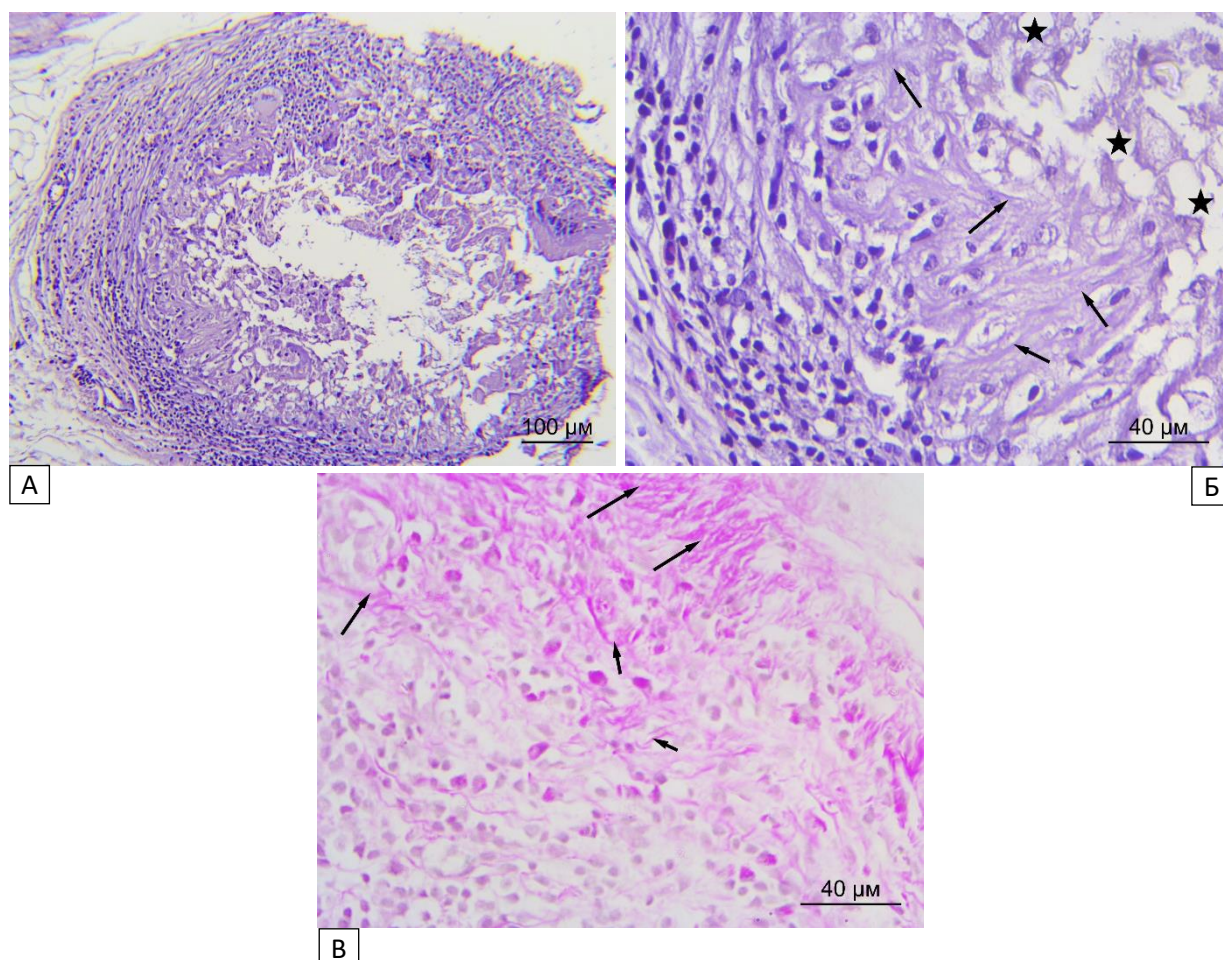


Рисунок 4. Центральный отдел седалищного нерва кролика контрольной группы через 3,5 месяца после компрессии. Звездочки – деструктивно измененные волокна, стрелки – соединительно-тканые волокна. Окраска: гематоксилин-эозин (А, Б), по Ван-Гизону (В)
Увеличение: 100× (А), 400× (Б, В)

Через 3,5 месяца после компрессии седалищного нерва кроликов 2-й опытной группы и обертывания нерва ксенографтом АМ проксимальнее области компрессии нерв имел нормальное строение (рисунок 6 А). Не выявлено отека как периневрального, так и эндоневрального. Практически все нервные волокна были интактными, лишь в единичных отсутствовали осевые цилиндры или были оттеснены к периферии (рисунок 6 Б). Признаков фиброза не выявлено, эпинервий и перинервий нормальной толщины (рисунок 6 В).

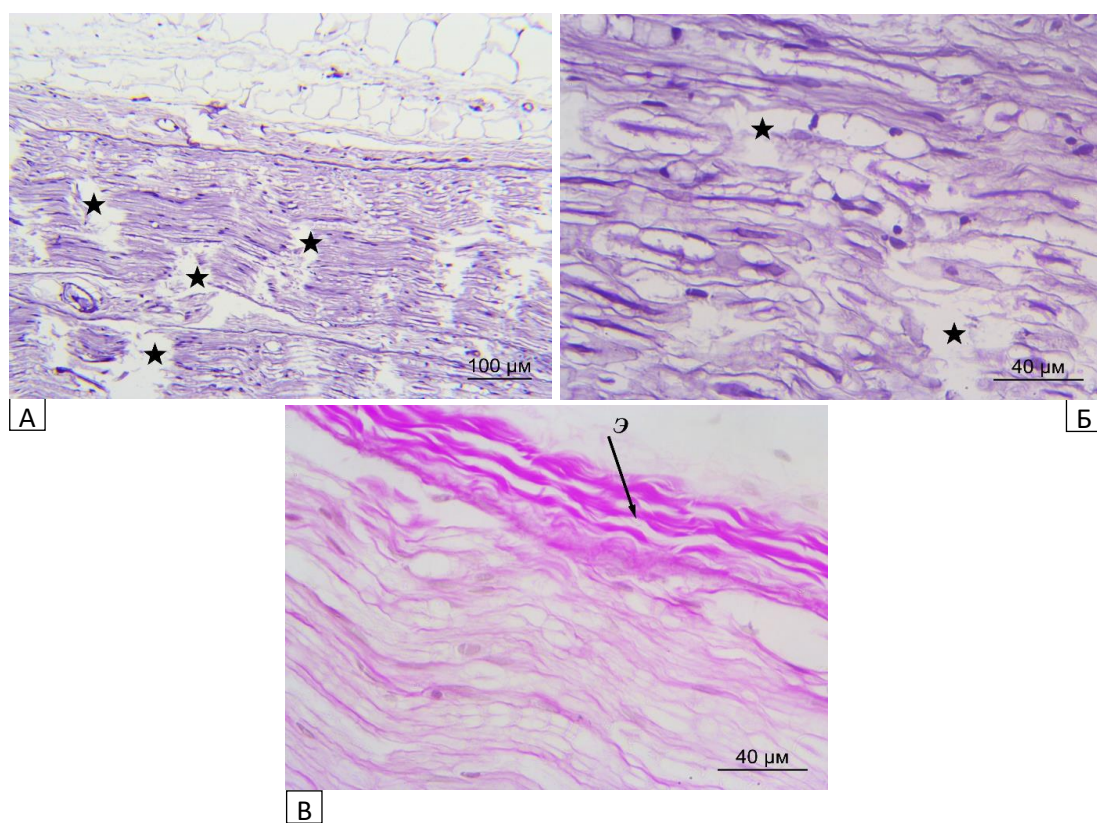


Рисунок 5. Дистальный отдел седалищного нерва (продольный срез) кролика контрольной группы через 3,5 месяца после компрессии. Звездочки – деструктивно измененные волокна, Э – эпинервий. Окраска: гематоксилин-эозин (А, Б), по Ван-Гизону (В). Увеличение: 100× (А), 400× (Б, В)

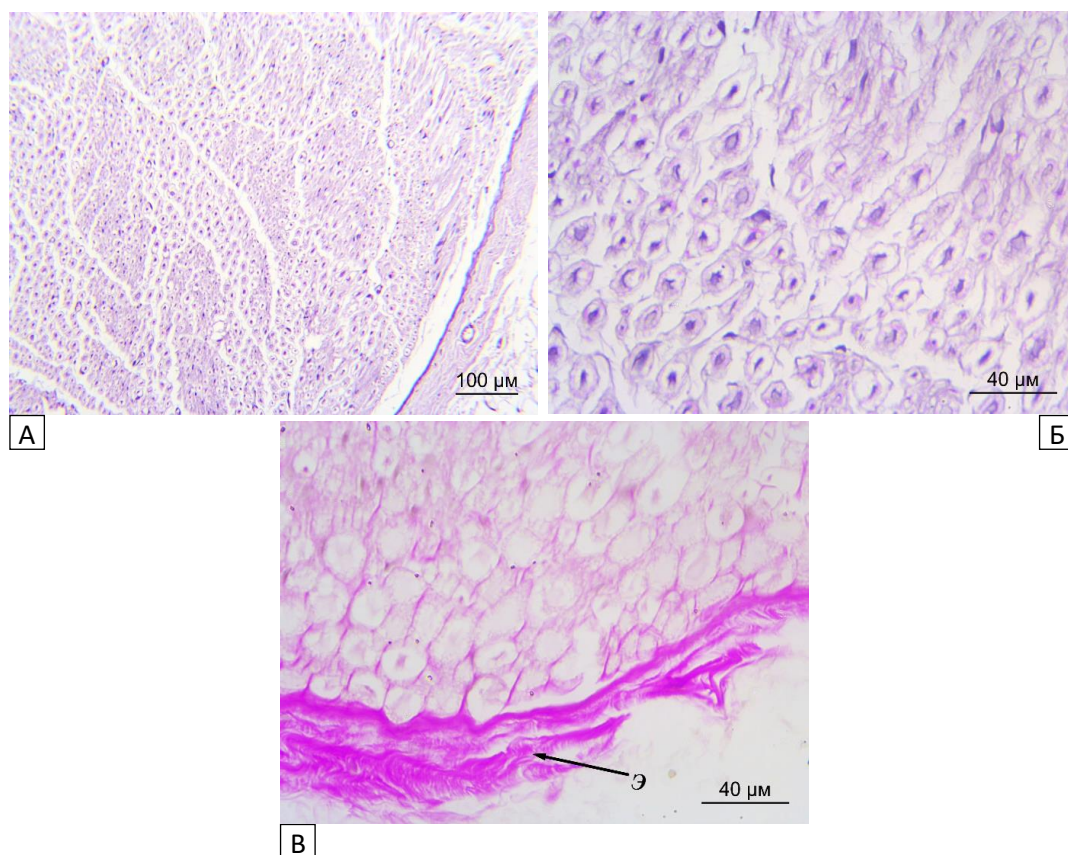


Рисунок 6. Проксимальный отдел седалищного нерва кролика опытной группы через 3,5 месяца после компрессии и ААМ. Э – эпинервий. Окраска: гематоксилин-эозин (А, Б), по Ван-Гизону (В). Увеличение: 100× (А), 400× (Б, В)

В области компрессии седалищного нерва после тубулизации ксенографтом АМ через 3,5 месяца наблюдали полное восстановление гистологической структуры нерва (рисунок 7 А). Все нервные волокна имели нормальное строение, в них определялись осевые цилиндры, миелиновые оболочки (рисунок 7 Б). Признаки отека, воспаления и дегенерации отсутствовали. При окраске по Ван-Гизону у кроликов 2-й опытной группы не выявлено разрастания соединительно-тканых структур (рисунок 7 В).

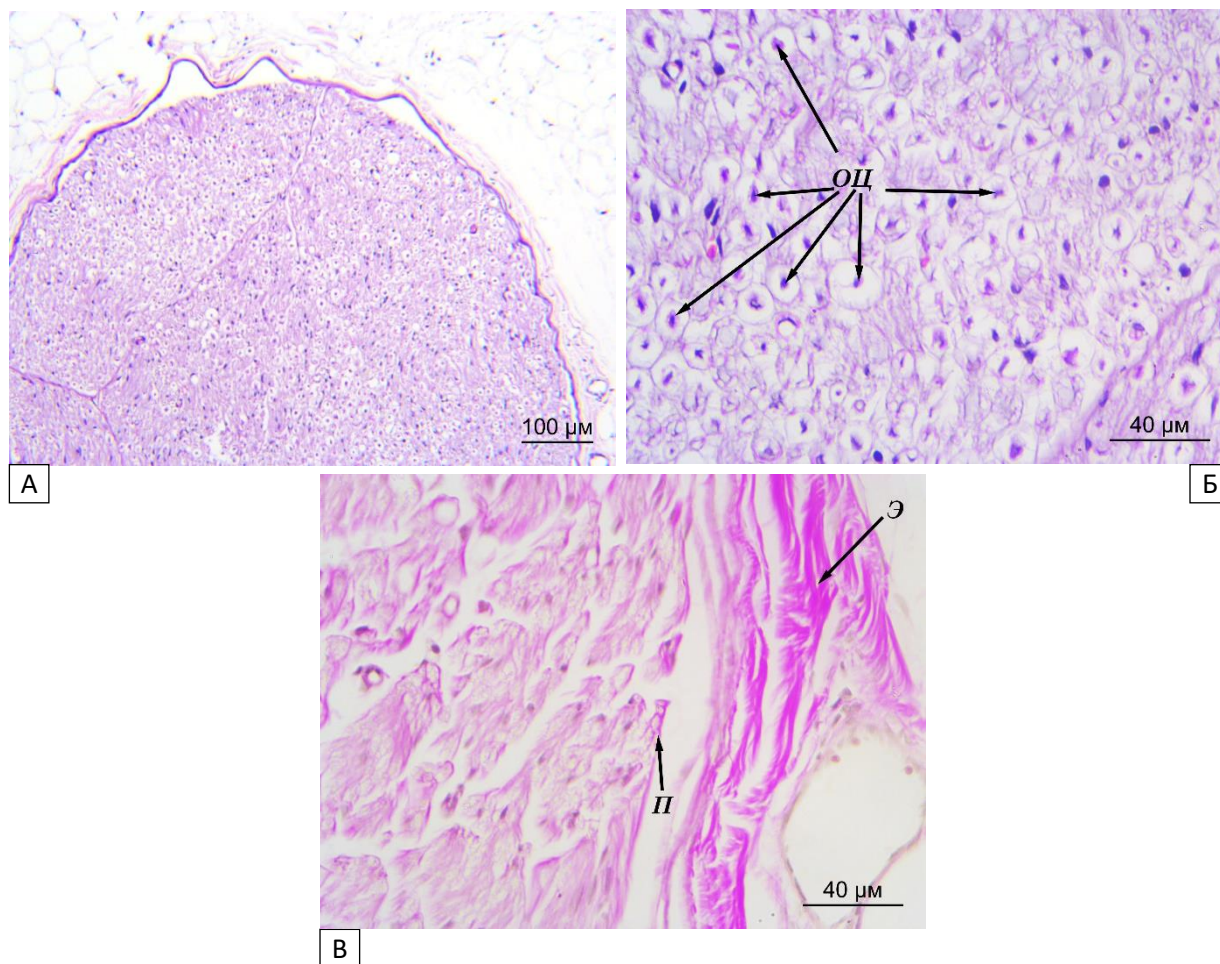


Рисунок 7. Центральный отдел седалищного нерва кролика опытной группы через 3,5 месяца после компрессии и ААМ. ОЦ – осевые цилиндры, Э – эпинервий, П – перинервий. Окраска: гематоксилин-эозин (А, Б), по Ван-Гизону (В). Увеличение: 100× (А), 400× (Б, В)

В дистальном отделе седалищного нерва кролика после компрессии и применения ксенографта АМ на гистологических препаратах наблюдали нормальное строение нерва и его структур (рисунок 8 А). На продольных срезах нерв имел волнообразную слоистую структуру, без отеков и участков расслоения (рисунок 8 Б). Утолщения соединительно-тканых прослоек не выявлено (рисунок 8 В).

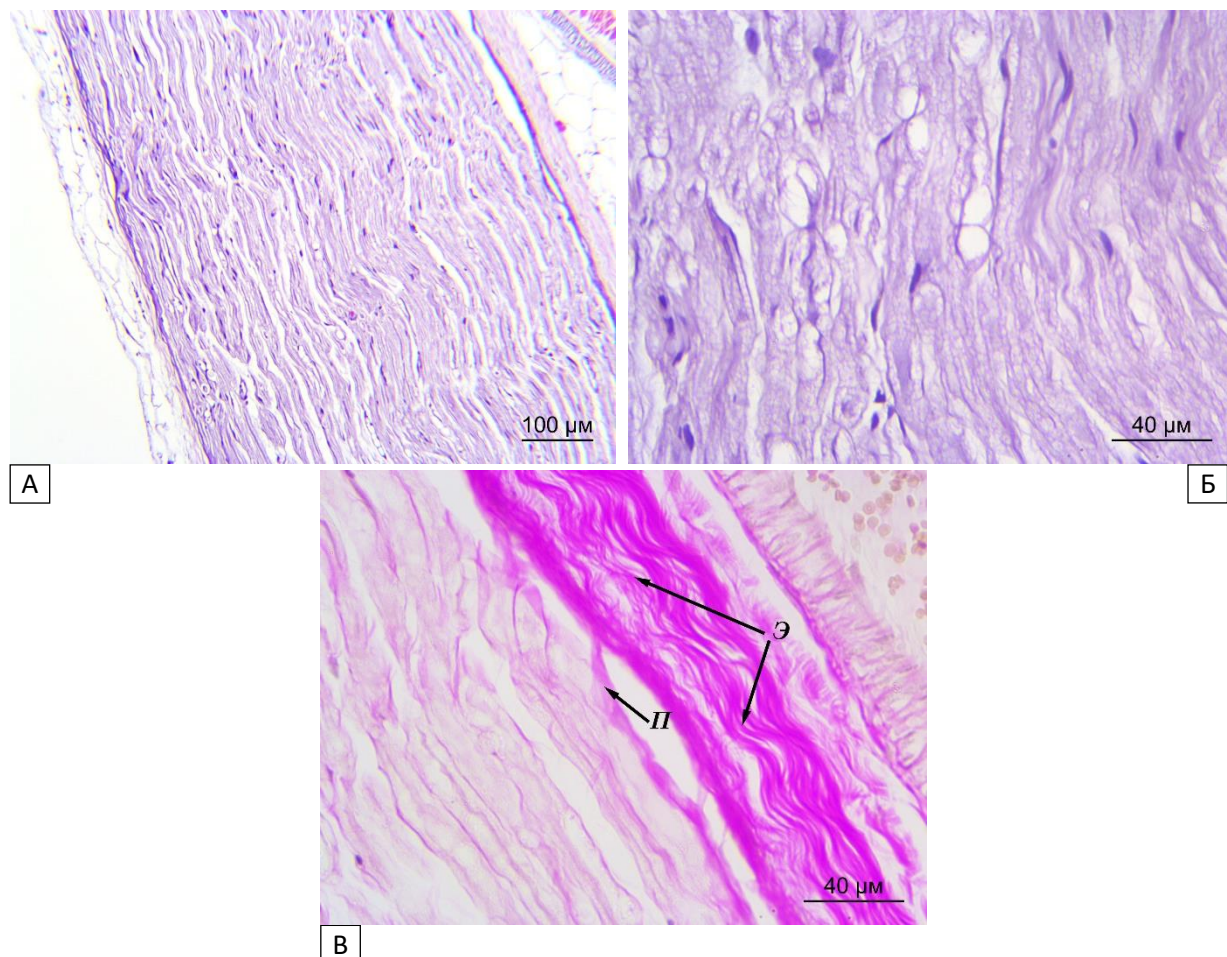


Рисунок 8. Дистальный отдел седалищного нерва (продольный срез) кролика опытной группы через 3,5 месяца после компрессии и ААМ. Э – эпинервий, П – перинервий. Окраска: гематоксилин-эозин (А, Б), по Ван-Гизону (В). Увеличение: 100× (А), 400× (Б, В)

Таким образом, получены убедительные морфологические данные об эффективности использования трансплантата АМ при моделировании КИН седалищного нерва на кроликах. Результаты проведенных экспериментальных исследований создали предпосылки для клинического использования трансплантата АМ в хирургическом лечении туннельных синдромов верхних конечностей с целью профилактики рубцово-спаечного процесса, воспалительных реакций и улучшения условий регенерации поврежденных аксонов.

Выводы.

1. Разработана верифицированная модель КИН седалищного нерва в эксперименте на кроликах. Компрессию нерва в течение 30 мин осуществляли с помощью унифицированного устройства, позволяющего контролировать повреждение нерва и проводить расчет его поперечного механического напряжения. Суммарная величина силы, действующей на сжимающие плоскости устройства составила 1,7 Н.

2. В различные сроки (через 2, 3, 4–6 недель) после моделирования КИН седалищного нерва при использовании ксенографта АМ установлена динамика морфологических изменений, в частности в соединительной ткани эпинеурия выявлена выраженная лимфоидная и эозинофильная инфильтрация, формирование лимфоидных узелков на границе с ксенографтом, что, вероятно, обусловлено развитием иммунологической несовместимости ксенографта АМ человека с тканью кролика. Через 2, 3 и 4 недели внутри пучков между нервными волокнами отмечаются диффузные, а через 6 недель очаговые разрастания соединительной ткани. Спектр и степень выраженности морфологических проявлений демиелинизации, дегенерации и регенерации нервных волокон варьируют в разных пучках с преимущественными явлениями регенерации на более поздних сроках наблюдения.

3. Через 3,5 месяца после моделирования КИН седалищного нерва при использовании трансплантата АМ установлено практически полное восстановление гистологической структуры нерва без развития фиброза. В контрольной группе в этом же сроке сохранялись дегенеративные изменения в части пучков седалищного нерва.

4. Морфологические данные полученные нами после моделирования КИН седалищного нерва кроликов и использования трансплантата АМ создали объективные предпосылки для клинической апробации предложенного метода профилактики рубцово-спаечного процесса в хирургическом лечении туннельных КИН верхних конечностей.

Литература:

- [1]. Abe Y., Doi K., Kawai S. An experimental model of peripheral nerve adhesion in rabbits // Br. J. Plast. Surg. 2005. Vol. 58(4). P. 533–540.
- [2]. Bourgeois M. et al. Can the Amniotic membrane be used to treat peripheral nerve defects // Hand Surg. Rehabil. 2019. Vol. 38. № 4. P. 223–232.
- [3]. Cox C.T. et al. Evaluation of postoperative outcomes in patients following multilevel surgical reconstruction with the use Avive soft tissue membrane on nerve // Sage open Medicine. 2021. Vol. 90. P. 1–14.
- [4]. Duan-Arnold Y. et al. Retention of endogenous viable cells enhances the anti-inflammatory activity of cryopreserved amnion // Adv. Wound Care. 2015. Vol. 4. № 9. P. 523–533.
- [5]. Kim S.S. et al. Use of human amniotic membrane wrap in reducing perineural adhesion in a rabbit model ulnar nerve neurorrhaphy // J. Hand Surg. Eur. 2010. Vol. 35. № 3. P. 214–219.
- [6]. Lemker A. et al. Transplantation of human amnion prevents recurring adhesion and ameliorates fibrosis in a rat model of sciatic nerve scarring // Acta Biomater. 2018. Vol. 66. P. 335–349.
- [7]. Meng H. et al. Assessment of processed human amniotic membrane as a protective barrier in rat model of sciatic nerve injury // Neurosc. Lett. 2011. Vol. 496. № 1. P. 48–53.
- [8]. Orozco E., Masuda K., Shah S.B. A guide to reducing adverse outcomes in rabbit models of sciatic nerve injury // Lab. Animal Res. 2021. Vol. 37. № 1. P. 13–17.
- [9]. Ozgenel G.L., Filiz G. Combined application of human amniotic membrane wrapping and hyaluronic acid injection in epineurectomized rat sciatic nerve // J. Reconstr. Microsurg. 2004. Vol. 20. P. 153–157.
- [10]. Wolfe E.M. et al. Comparison of human amniotic membrane and collagen nerve wraps around sciatic nerve reverse autografts in rat // Biomat. and Biosyst. 2022. Vol. 6. № 1. P. 1–9.
- [11]. Alvites R. et al. Peripheral nerve injury and axonotmesis: State of the art and recent advances // Cogent Medicine. 2018. Vol. 5. №. 1. Art. 1466404.
- [12]. Нуут А.Ю. В помощь экспериментаторам: модель изолированной травмы нерва и надежный способ контроля реиннервации мышц-мишеней восстановленного нервного ствола // Оперативная хирургия и клиническая анатомия. 2021. Т.5 (4). С. 22–25.
- [13]. Crosio A. et al. A simple and reliable method to perform biomechanical evaluation of postoperative nerve adhesions // J. Neurosci Methods. 2014. Vol. 233. P. 73–77.
- [14]. Driscoll P.J., Grasby M.A., Lawson G.M. An *in vivo* study of peripheral nerves in continuity: biomechanical and physiological responses to elongation // Journal of Orthopaedic Research. 2002. Vol. 20. P. 370–375.
- [15]. Savastano L. et al. Sciatic nerve injury. A simple and subtle model for investigating many aspects of nervous system damages // Neuroscience Methods. 2014. Vol. 227. P. 166–180.
- [16]. Carvalho C.R., Oliveira J.M., Reis R.L. Modern trends for peripheral nerve repair and regeneration: beyond the hollow nerve guidance conduit // Front. Bioeng. Biotechnol. 2019. Vol. 7. P. 1–30.
- [17]. Gao Y., Weng C., Wang X. Changes in nerve microcirculation following peripheral nerve compression // Neural Regen Res. 2013. Vol. 8, № 11. P. 1041–1047.
- [18]. Menorca R.M., Fussell T.S., Elfar J.C. Nerve physiology: mechanisms of injury and recovery // Hand Clinics. 2013. Vol. 29. № 3. P. 317–330.
- [19]. Kuffler D. Promoting axon regeneration and neurological recovery following traumatic peripheral nerve injuries // Inter. J. Neurorehabilitation. 2015. Vol. 2. № 1.
- [20]. Mackinnon S.E. Pathophysiology of nerve compression // Hand Clinics. 2002. Vol. 18 (2). – P. 231–241.
- [21]. Mascear V.R. Nerve wrapping // Foot Ankle Clin. 2011. Vol. 16 (2). P. 327–337.
- [22]. Shintani K. et al. Protective effect of biodegradable nerve conduit against peripheral nerve adhesion after neurolysis // J. Neurosurg. 2018. Vol. 129 (3). P. 815–824.

- [23]. Duerr R.A., Ackermann J., Gomoll A.N. Amniotic-derived treatment and formulation // Clin. Sports Med. 2019. Vol. 38. № 1. P. 45–59.
- [24]. Нечипуренко Н.И. и др. Морфологическая верификация экспериментальной модели компрессионно-ишемической невропатии в раннем периоде исследований // Актуальные проблемы неврологии и нейрохирургии. 2023. Вып. 26. С.148–159.
- [25]. Мансуров В.А. и др. Моделирование компрессионно-ишемической невропатии // БГМУ – в авангарде медицинской науки и практики: сб. научн. трудов. 2023. Вып. 13. С. 23–28.
- [26]. Mott, P.H., Roland C.M. Limits to Poisson's ratio in isotropic materials // Phys. Rev. 2009. Vol. 80. P. 104–132.
- [27]. Трушель Н.А., Нечипуренко Н.И., Юзефович Н.А. и др. Структурные изменения седалищного нерва кролика после компрессии с последующим использованием аллотрансплантата амниотической мембраны // Анатомия в XXI веке – традиция и современность: матер. Всерос. научной конф., посвящ. 120-летию проф. М.Г.Привеса и 125-летию кафедры клин. анатомии и опер. Хирургии Первого С-Пб гос. Мед. университета. Воронеж : «Научна книга», 2024. С. 244–246.

N. I. NECHIPURENKO¹, T. E. KUZNECOVA², E. A. KOROTKEVICH¹, I. D. PASHKOVSKAYA¹,
E. SH. RAHMONOV¹, N. A. TRUSHEL³, N. A. YZEFOVICH³

MORPHOLOGICAL CHANGES IN THE SCIATIC NERVE IN MODELING COMPRESSION-ISCHEMIC NEUROPATHY USING AN AMNIOTIC MEMBRANE TRANSPLANT

¹ State Institution “Republican Scientific and Practical Center of Neurology and Neurosurgery”, Minsk, Republic of Belarus

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

³ Educational Establishment “Belorussian State Medical University”, Minsk, Republic of Belarus

Summary

A verified model of compression-ischemic neuropathy (CIN) of the sciatic nerve was developed in an experiment on rabbits. Characteristic morphological abnormalities were found in the central, proximal and distal sections of the compressed sciatic nerve after 1, 2, 4-6 weeks and 3,5 months of CIN modeling. The results of morphological changes after 3,5 months of CIN modeling and subsequent wrapping it with a xenograft of human amniotic membrane demonstrated almost complete restoration of the histological structure of the sciatic nerve without the development of fibrosis. In the control group, degenerative changes in some of the sciatic nerve bundles persisted at the same time.

Keywords: compression-ischemic neuropathy, sciatic nerve, model verification, morphology, amniotic membrane transplant.

С. А. НОВАКОВСКАЯ, Е. В. ФЁДОРОВА, А.-М. В. ЕРОФЕЕВА, М. В. СИМОНЧИК,
А. А. БАСАЛАЙ

ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ МИОКАРДА ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ХРОНИЧЕСКОЙ ИЗОПРОТЕРЕНОЛ- ИНДУЦИРОВАННОЙ ИШЕМИИ СЕРДЦА

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

Получены морфологические данные, иллюстрирующие динамику развития морфо-функциональных изменений в сердечной мышце и сосудах микроциркуляторного русла сердца крыс при моделировании хронической ишемии миокарда на поздних этапах ее развития, которая сопровождается расширением полей внеклеточного матрикса и уменьшением площади неповрежденного миокарда. Разрастания волокнистой соединительной ткани значительно повышают жесткость сердечной мышцы и являются причиной нарушения сократительной функции сердца.

Ключевые слова: миокард, кардиомиоциты, микроциркуляторное русло, ишемия, фиброз.

Введение. Ишемическая болезнь сердца (ИБС) занимает ведущее место среди других заболеваний по своей медико-социальной значимости, распространенности, влиянию на общую заболеваемость и нарушению трудоспособности во всех странах мира. Актуальность проблемы ИБС обусловлена значительными экономическими затратами в связи с прогрессирующим течением заболевания, ранней инвалидизацией и высоким уровнем смертности. Важное значение в лечении пациентов с ИБС, улучшении качества их жизни и снижении смертности имеет изучение данной патологии и раннее ее выявление.

ИБС – это поражение миокарда, обусловленное расстройством коронарного кровообращения, при котором отмечается нарушение соответствия между коронарным кровотоком и метаболическими потребностями сердечной мышцы. Причиной снижения коронарного кровотока является уменьшение доставки кислорода к миокарду вследствие окклюзирующего коронарного тромбоза, спазма, гипотензии, микроваскулярной дисфункции. Основными патогенетическими факторами развития ишемии миокарда являются атеросклеротическое поражение коронарных артерий, формирование атеросклеротических бляшек с последующим стенозированием сосудов, а также динамическая обструкция атеросклеротически измененных коронарных артерий. К факторам риска развития ИБС относятся гиперхолестеринемия, артериальная гипертензия, сахарный диабет, ожирение.

В прогрессировании ишемии миокарда большую роль отводят эндотелиальной дисфункции (ЭД), на фоне которой отмечается избыточная продукция эндотелиальных факторов, обладающих прокоагулянтным и проагрегантным действием, а также тромбоцитарно-сосудистому гемостазу, который участвует в развитии тромбоза и спазма коронарных артерий. Одним из важных механизмов возникновения ЭД является гиперактивность ренин-ангиотензин-альдостероновой системы с повышенной выработкой ангиотензинпревращающего фермента, способствующего образованию ангиотензина II поколения, который является мощным активатором сердечных фибробластов [1]. Нарушение синтеза оксида азота способствует снижению локального сосудистого кровотока, дисбалансу синтеза цитокинов и вазоконстрикторов эндотелия, пролиферации гладкомышечных клеток [2]. Прогрессирование ЭД сопровождается повышением образования эндотелина I,

фактора ремоделирования сосудистой стенки, уровень экспрессии которого повышается в атеросклеротически измененных артериях.

В основе процесса ишемического ремоделирования миокарда лежит гибель кардиомиоцитов (КМЦ), которая происходит путем некроза и апоптоза. Основным процессом, определяющим потерю клеточной массы сердца, является некроз КМЦ, приводящий к возникновению воспалительной реакции, пролиферации сосудистых клеток, макрофагальной инфильтрации, активации фибробластов, формированию рубца. Апоптоз КМЦ оканчивается образованием апоптотических тел без активации воспалительной реакции. В плазме крови повышается содержание проапоптотических лигандов (Fas-L, TNF- α), а также количество рецепторов к соответствующим факторам на поверхности КМЦ (Fas-R, TNF-R1) [3].

Длительно протекающая ИБС заканчивается формированием хронической сердечной недостаточности (ХСН), сопровождающейся функциональным и морфологическим ремоделированием миокарда, интенсивность которого в значительной степени определяется реактивными изменениями внеклеточного матрикса, основу которого формируют структурные белки – эластин, фибронектин, ламинин, коллагены I и III типов [4]. Аккумуляция коллагена в миокарде осуществляется путем формирования очагового заместительного фиброза, при котором погибшие КМЦ замещаются рубцовой тканью, и диффузного фиброза, при котором патологический процесс сопровождается избыточным отложением коллагена в интерстициальном и периваскулярном пространствах миокарда за счет преобладания процессов его синтеза над распадом. От соотношения количества коллагенов I и III типов в зоне повреждения сердечной мышцы, от их биофизических свойств зависит жесткость миокарда.

В терапевтической коррекции ИБС широкое применение получил бета-адреноблокатор карведилол, основным фармакологическим эффектом которого является снижение потребления миокардом кислорода за счет уменьшения частоты сердечных сокращений, увеличения доставки кислорода к миокарду вследствие увеличения коллатерального и усиления коронарного кровотока в ишемизированных участках сердечной мышцы, уменьшения дисфункции и гибели КМЦ путем некроза и апоптоза. Важное значение имеет сочетание карведилола с ингибитором рецепторов ангиотензина-неприлизина, сформированного комбинированной молекулой сакубитрил/валсартана, который подавляет сигнальные пути, участвующие в сердечном фиброзе, ремоделировании матрикса и апоптозе. Сочетанное применение карведилола и валсартан/сакубитрила значительно повышает выживаемость пациентов, снижает смертность от сердечно-сосудистых осложнений.

В целях изучения клеточных механизмов патогенеза хронической сердечно-сосудистой недостаточности на поздних этапах ишемического поражения миокарда была поставлена задача – изучить характер и последовательность развития патоморфологических процессов в сердечной мышце на разных этапах моделирования хронической ишемии сердца, а также после комплексного действия препаратов карведилол и валсартан/сакубитрила.

Материалы и методы исследования. Исследования проведены на 40 половозрелых крысах-самцах линии Вистар массой 180–200 г с соблюдением правовых и этических норм обращения с животными в соответствии с национальными и международными стандартами качества планирования и проведения исследований на животных [5]. На данное исследование получено разрешение комитета по биоэтике Института физиологии НАН Беларуси (протокол № 1 от 24.01.2024 г.).

Для создания модели хронического ишемического поражения миокарда и развития ХСН ишемического генеза экспериментальным животным вводился β -адреномиметик изопротеренол подкожно в дозе 10 мг/кг/сут в течение 14 суток [6]. Комплекс препаратов – карведилол и валсартан/сакубитрил из расчета 4,5 мг/кг и 68 мг/кг, соответственно, вводился крысам с моделированной хронической ишемией миокарда *per os* на протяжении 21 суток [7, 8].

Экспериментальные животные были разделены на группы: 1 группа – интактные крысы ($n = 10$); 2 группа – крысы с моделированной хронической ишемией миокарда (3 недели) + 4 недели / срок мониторинга 7 недель ($n = 10$); 3 группа – крысы с моделированной хронической ишемией миокарда (3 недели) + 8 недель / срок мониторинга 11 недель ($n = 10$); 4 группа – крысы с моделированной хронической ишемией миокарда (3 недели) + карведилол и валсартан/сакубитрил (3 недели) + 7 суток / срок мониторинга 7 недель ($n = 10$).

В работе использованы гистологические и иммуногистохимические методы исследования. Биоптаты сердца подвергались парафиновой заливке. Парафиновые срезы толщиной 4 мкм готовились с помощью ротационного микротомы CUT 5062 (SLEE Medical, Германия), наносились на стекла и окрашивались гематоксилином и эозином. Часть парафиновых срезов подвергалась окраске по Массону с целью дифференцировки и выявления элементов соединительной ткани, которые окрашивались в синий цвет. Исследование материала проводилось на световом микроскопе Altami LUM-1 (Россия), оснащенного цифровой камерой. Площадь фиброза миокарда определялась при помощи программы Image J (1.49k, США).

Иммуногистохимические исследования выполнялись на парафиновых срезах с применением поликлональных кроличьих антител к саркомерному α -актину-2 (ACTN2, alpha actinin 2, FNab00121, «FineTest», КНР), к сердечному тропонину Т (TNNT2, cardiac troponin T, E-AB-70232, «Elabscience», КНР) в рабочем разведении 1 : 300, к коллагену I типа (Col I, collagen Type I, E-AB-70322, «Elabscience», КНР) в рабочем разведении 1 : 400, к коллагену III типа (Col III, collagen Type III, FNab01838, «FineTest», КНР) в рабочем разведении 1 : 500. Все этапы исследования выполнялись согласно предложенному протоколу фирмы-производителя. Для визуализации иммуногистохимической реакции была использована система детекции с применением набора 2-step plus Poly-HRP Anti Rabbit IgG Detection System (E-IR-R217, «Elabscience», КНР).

Для количественной оценки результатов иммуногистохимического исследования микрофотографии гистологических срезов импортировали в среду компьютерной программы анализа изображений Aperio Image Scope (v 9.0.1.1506, США). Показатели анализировали по стандартному алгоритму подсчёта позитивных пикселей «PositivePixelCount v9». Позитивность рассчитывали, как отношение общего количества позитивных пикселей к общему количеству пикселей. Полученные результаты обрабатывали методами непараметрической статистики с помощью пакета прикладных программ Statistica 12.0 (Statsoft Inc., USA). Достоверными считали различия между контрольной и опытными группами при значениях $p < 0,05$ (Mann–Whitney U-test). Данные представлены в виде Me [Q1; Q3], где Me – медиана, Q1 – первый квартиль или 25-й процентиль, Q3 – третий квартиль или 75-й процентиль.

Результаты и их обсуждение. Гистологическое исследование миокарда экспериментальных крыс через 4 недели после моделирования хронической изопротеренол-индуцированной ишемии сердца выявило картину реорганизации сердечной мышцы с изменением ее архитектоники. В миокарде формируются многочисленные очаги пересокращения КМЦ и беспорядочно направленных волнообразно деформированных пучков мышечных волокон. Часть волокон истончена за счет их разволокнения и частичного разрушения, другие волокна гипертрофированы и отечны. Наблюдаются фрагментированные участки мышечных волокон миокарда с очагами их пересокращения, зернисто-глыбчатым распадом цитоплазмы КМЦ и разрушением ядер (рисунок 1а). Отмечаются участки миокарда с отечными КМЦ, имеющие просветленную цитоплазму и крупные округлые ядра со светлой нуклеоплазмой и нечетко выраженной нуклеолеммой, которые претерпевают некробиотические изменения и разрушаются. В толще миокарда выявляются многочисленные очаги некроза, где разрушенные КМЦ полностью замещаются волокнами соединительной ткани различной степени зрелости, между которыми определяются скопления дифференцированных функционально активных фибробластов с крупными

темными ядрами и фиброциты (рисунок 1б). Разрастание соединительной ткани между пучками мышечных волокон миокарда указывает на прогрессирование процесса коллагенообразования и формирование интерстициального фиброза.

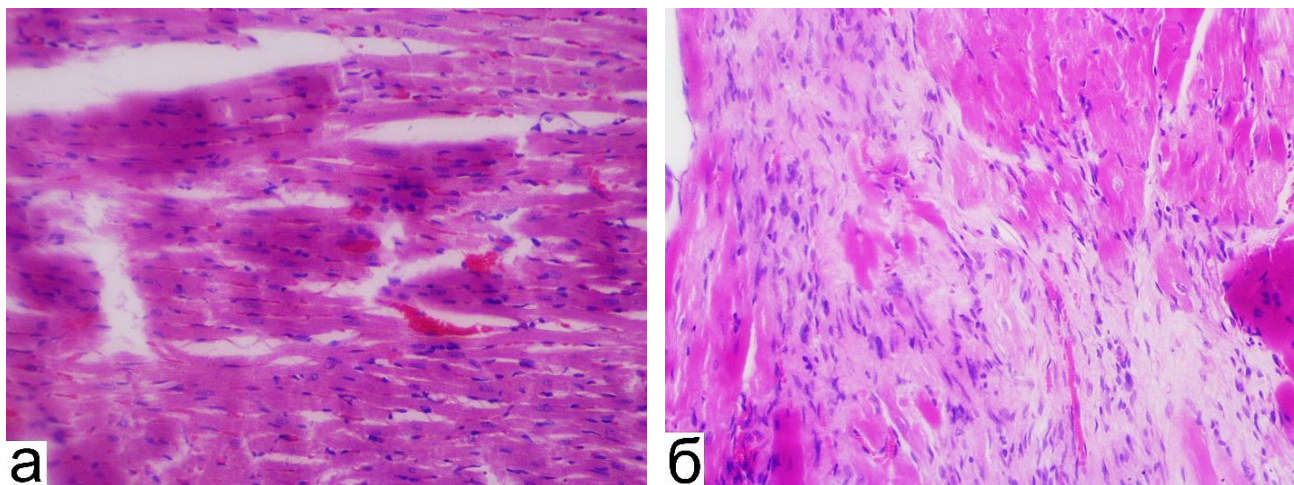


Рисунок 1. Структурная организация миокарда через 4 недели после моделирования хронической ишемии сердца. Фрагментированные участки миокарда (а); очаги некроза сердечной мышцы (б) (окраска гематоксилином и эозином, увеличение $\times 200$)

Исследование сосудов микроциркуляторного русла миокарда показало развитие микроангиопатий на фоне прогрессирования ЭД. В сосудистых просветах отмечается стаз и агрегация эритроцитов, их адгезия к эндотелию, что обуславливает сладж-феномен. Перикапиллярные пространства умеренно расширены, заполнены рыхлой аморфной массой, содержат тонкие прослойки соединительной ткани и скопления фибробластов. Повышение проницаемости сосудистой стенки способствует образованию множественных диапедезных очагов кровоизлияния в сердечной мышце и внутрикардиальных тромбов (рисунок 2а).

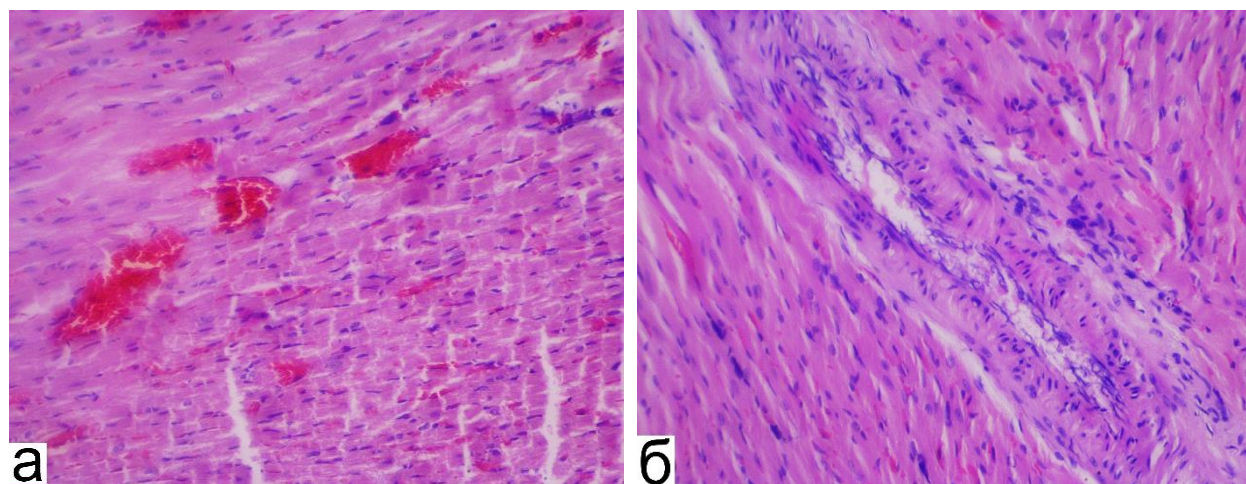


Рисунок 2. Структурная организация миокарда через 4 недели после моделирования хронической ишемии сердца. Очаги диапедезных кровоизлияний и внутрикардиальные тромбы (а); повреждение эндотелиальной выстилки, класмотоз некротически поврежденных клеток эндотелия в просвет сосуда (б) (окраска гематоксилином и эозином, увеличение $\times 200$)

В очагах заместительного фиброза миокарда, в толще соединительнотканых волокон, выявляются новообразованные полнокровные капилляры с очагами диапедезных кровоизлияний. Повышение сосудистой проницаемости приводит к накоплению в стенке артериол белков, фибрина, гликозамингликанов, что способствует их плазматическому

пропитыванию и отеку. В интима стенок артериол выявляются липидные включения (полоски), указывающие на начальные признаки атеросклеротического поражения сосудов. Эндотелиальный слой сосудов деформирован за счет многочисленных выступов и складок, выбухания клеток эндотелия в просвет сосудов, мукоидного отека и липидной инфильтрации. На некотором протяжении эндотелиальная выстилка артериол повреждена вследствие некротического распада выстилающих ее эндотелиоцитов, деструкции базальной мембраны, формирования очагов подэндотелиального отека (рисунок 2б). Периваскулярные пространства артериол умеренно отечны. В их толще выявляются множественные скопления фибробластов, которые являются источником синтеза молодой соединительной ткани и формирования очагов периваскулярного фиброза.

Гистологическое исследование миокарда экспериментальных крыс через 8 недель после моделирования хронической изопроterenол-индуцированной ишемии сердца показало дальнейшее прогрессирование процессов коллагенообразования, расширение полей внеклеточного матрикса, уменьшение площади неповрежденного миокарда. Мышечные волокна сердечной мышцы разобщены, имеют разнонаправленный волнообразный ход. Многочисленные очаги пересокращения и разволокнения миофибрилл создают картину неоднородного миокарда (рисунок 3а). Сердечные миоциты, прилежащие к очагам фиброза, претерпевают изменения дистрофического характера и имеют отечную цитоплазму с очагами лизиса миофибрилл, содержат мелкие вакуоли, сконцентрированные преимущественно в перинуклеарной области, крупные просветленные ядра. Большая часть мышечных волокон сердечной мышцы истончена и фрагментирована. Множественные очаги некроза КМЦ подвергаются протеолизу, распаду и резорбции макрофагами, а затем полностью замещаются волокнистой соединительной тканью, источником синтеза которой являются многочисленные фибробласты. Разрастания коллагеновых волокон имеют четкие границы, распространяются в толщу неповрежденного миокарда и образуют плотный каркас вокруг сохранившихся пучков мышечных волокон (рисунок 3б), который значительно повышает жесткость миокарда и является причиной нарушения сократительной функции сердца.

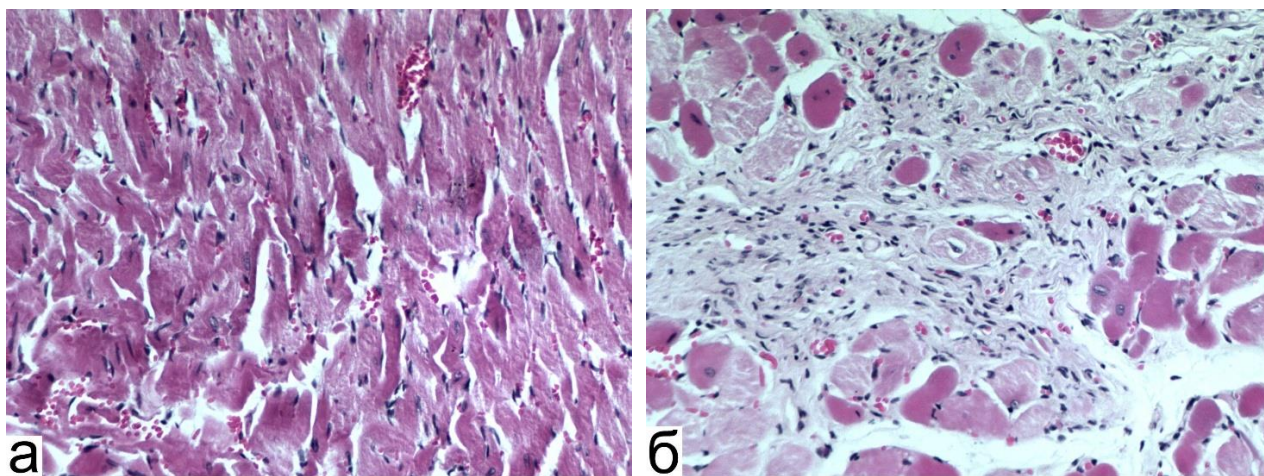


Рисунок 3. Структурная организация миокарда через 8 недель после моделирования хронической ишемии сердца. Многочисленные очаги пересокращения и разволокнения миофибрилл (а); разрастания соединительной ткани на месте разрушенных КМЦ и между пучками мышечных волокон (б) (окраска гематоксилином и эозином, увеличение $\times 200$)

Структурная реорганизация сердечной мышцы сопровождается апоптозом КМЦ. На участках миокарда, прилежащих к очагам заместительного фиброза, выявляются апоптотически измененные КМЦ и апоптотические тельца с темными фрагментированными ядрами, узким ободком цитоплазмы и распавшимися миофиламентами. Характерно

появление очагов миоцитолита, формирующихся в результате распада пучков мышечных волокон и активизации процессов аутофагии.

Капилляры микроциркуляторного русла миокарда полнокровны, отмечается стаз эритроцитов в их просветах, скопления жидкой части плазмы крови, а повышенная проницаемость сосудистых стенок способствует образованию множественных паренхиматозных диапедезных кровоизлияний и тромбов. В зонах заместительного фиброза миокарда, в толще пролиферирующих волокон соединительной ткани, выявляются новообразованные полнокровные капилляры, которые к данному сроку ишемии достигают дифференцировки на артериальные и венозные. Просветы артериол спазмированы вследствие мукоидного набухания и плазматического пропитывания их стенок. Эндотелиальная выстилка истончена, имеет множество выростов и фрагментирована в местах десквамации некротически поврежденных эндотелиоцитов в просвет сосудов, часть гипертрофированных эндотелиоцитов выбухает в сосудистые просветы в виде частокола. На некоторых участках эндотелий имеет выраженные деструктивные изменения вплоть до оголения внутренней эластической мембраны. Между сохраненными клетками эндотелия выявляются крупные липидные капли, отмечается диапедез эритроцитов в толщу мышечного слоя. Мышечная оболочка артериол неоднородна за счет гипертрофии и отека мышечных клеток, инфильтрации ее жировыми каплями и вакуолями (рисунок 4а).

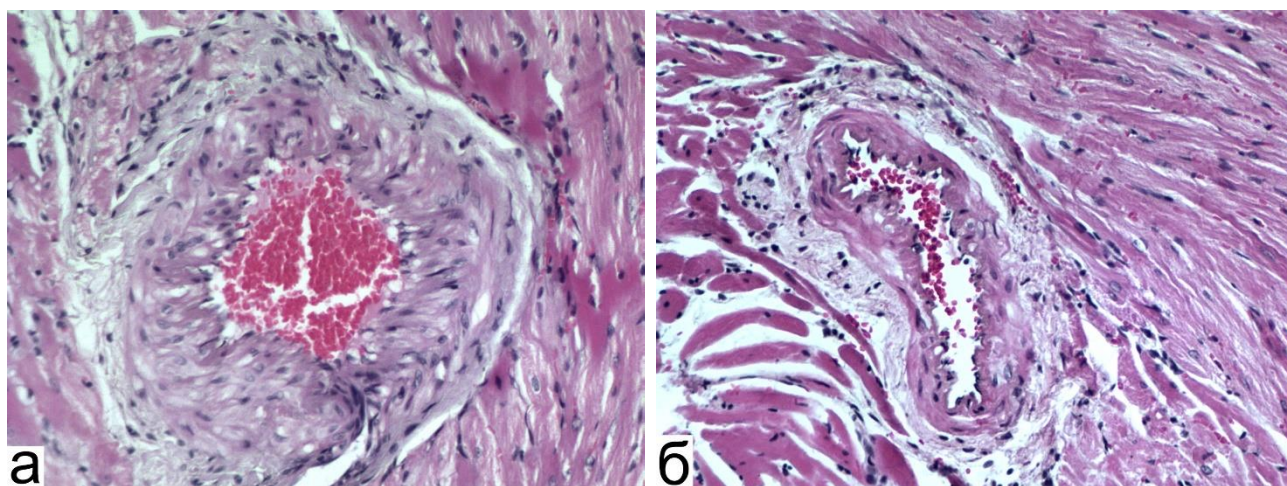


Рисунок 4. Структурная организация миокарда через 8 недель после моделирования хронической ишемии сердца. Гипертрофия, отек и липидная инфильтрация мышечных клеток стенки сосуда (а); периваскулярный фиброз (б) (окраска гематоксилином и эозином, увеличение $\times 200$)

Наблюдается расширение периваскулярных пространств миокарда вследствие их отека и разрастания плотной сети коллагеновых волокон, формирующих вокруг артериол плотный соединительнотканый каркас (рисунок 4б). Отмечается прогрессирование периваскулярного фиброза, который охватывает широкую сеть сосудов микроциркуляторного русла миокарда, способствует повышению жесткости миокарда и развитию недостаточности кровообращения.

Гистологическое исследование миокарда экспериментальных крыс после моделирования хронической изопротеренол-индуцированной ишемии сердца и последующего комплексного введения препаратов карведилол и валсартан/сакубитрила выявило кардиопротекторный эффект последних, которые, воздействуя на разные звенья патогенеза ишемии сердечной мышцы, оказывают антиишемическое действие и способствуют дилатации коронарных сосудов. Структурная реорганизация миокарда экспериментальных животных с индуцированной хронической ишемией сердца на фоне действия препаратов протекает менее интенсивно, наблюдается тенденция к восстановлению его архитектоники и функциональной активности.

Исследование микроциркуляторного русла миокарда выявило ангиопротекторный эффект вводимых препаратов и восстановление структурно-функциональной организации сосудов. Эндотелиальная выстилка на большем протяжении сохраняет свою целостность. Наблюдается незначительная складчатость внутренней эластической мембраны, умеренное выбухание эндотелиальных клеток в просвет сосудов при отсутствии их некротического повреждения и клазматоза. В мышечной оболочке стенки артериол значительно сокращается количество очагов плазматического пропитывания и мукоидного набухания в результате ингибирования препаратами процессов воспаления, уменьшения выработки внутриклеточных активных форм кислорода и продуктов окисления. Отсутствие липидной инфильтрации сосудистых стенок свидетельствует об угнетении процессов их атеросклеротического повреждения. На фоне введения препаратов отмечается сокращение площадей фиброза периваскулярных пространств, что обусловлено снижением избыточного синтеза матриксных металлопротеиназ и коллагена [9].

Визуализация очагов разрастания соединительной ткани в сердечной мышце при помощи окраски срезов миокарда по Массону позволила морфометрически оценить площадь фиброза сердца экспериментальных крыс на поздних этапах развития хронической ишемии сердца (рисунок 5а, б) и после комплексного действия препаратов карведилола и валсартан/сакубитрила. Через 4 недели после индукции хронической ишемии сердца выявлено достоверное увеличение площади фиброза миокарда относительно контрольных значений на 13,0 % [10,2; 15,8], а через 8 недель площадь фиброза миокарда увеличилась до 25,0 % [22,5; 29,1] ($p = 0,001$ для всех групп). После проведения крысам с моделированной хронической ишемией сердца сочетанной терапии (карведилол и валсартан/сакубитрил) площадь фиброза миокарда сократилась на 18,3 % и 6,3 %, соответственно, относительно площади фиброза миокарда у животных с 8-ми недельной и 4-х недельной хронической ишемией, и составила 6,7 % [4,0; 9,0].

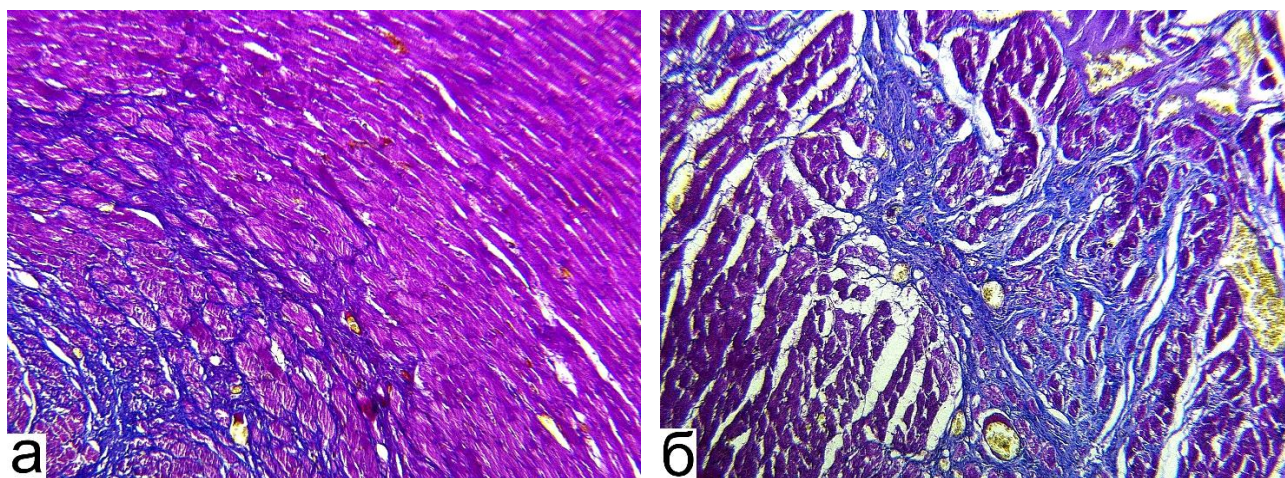


Рисунок 5. Очаги фиброза миокарда крыс после моделирования хронической ишемии сердца. А – через 4 недели после индукции ишемии, б – через 8 недель после индукции ишемии (окраска по Массону, увеличение $\times 100$)

Оценка иммуногистохимических маркеров повреждения миокарда сердечного тропонина (TNNT2) и саркомерного α -актинина-2 (ACTN2) показала достоверное снижение позитивности экспрессии сердечного тропонина в КМЦ экспериментальных крыс с 0,98 [0,96; 0,98] усл. ед. в контрольной группе животных до 0,87 [0,71; 0,89] усл. ед. ($p < 0,001$) во второй экспериментальной группе, и достоверное снижение позитивности экспрессии саркомерного α -актинина-2 с 0,96 [0,94; 0,97] усл. ед. в контроле до 0,86 [0,835; 0,905] усл. ед. ($p < 0,001$) спустя 4 недели после моделирования хронической ишемии сердца. Через 8 недель после индукции хронической ишемии сердца позитивность экспрессии TNNT2 и

ACTN2 снижалась до 0,74 [0,71; 0,79] усл. ед. и 0,80 [0,74; 0,81] усл. ед. ($p < 0,001$), соответственно. Сочетанное введение животным с моделированной хронической ишемией сердца карведилола и валсартан/сакубитрила способствовало достоверному повышению экспрессии TNNT2 и ACTN2 в КМЦ, соответственно, до 0,91 [0,91; 0,93] усл. ед. и до 0,93 [0,92; 0,97] усл. ед. ($p < 0,001$). Применение комплекса препаратов сопровождалось увеличением позитивности экспрессии TNNT2 в 1,05 и 1,23 раза в сравнении со второй и третьей экспериментальными группами, и увеличением позитивности экспрессии ACTN2 относительно групп сравнения в 1,08 и 1,16 раза.

Оценка иммуногистохимических маркеров, отражающих состояние экстрацеллюлярного матрикса миокарда, коллагена I и коллагена III (Col I и Col III) после моделирования хронической ишемии сердца показала достоверное увеличение позитивности экспрессии Col I от 0,13 [0,09; 0,175] усл. ед. у контрольных животных до 0,22 [0,17; 0,265] усл. ед. ($p < 0,001$) у животных через 4 недели после индукции хронической ишемии, значения которой оставались на данном уровне и через 8 недель после моделирования хронической ишемии миокарда. Позитивность экспрессии Col III достоверно повышалась на всех этапах моделирования хронической ишемии сердца – от 0,04 [0,03; 0,08] усл. ед. у контрольных животных до 0,10 [0,06; 0,14] усл. ед. ($p = 0,011$) у животных через 4 недели после индукции хронической ишемии сердца, до 0,17 [0,11; 0,20] усл. ед. ($p = 0,001$) – через 8 недель после индукции хронической ишемии. Сочетанное введение карведилола и валсартан/сакубитрила крысам с хронической ишемией миокарда сопровождалось статистически значимым снижением позитивности экспрессии Col I и Col III до 0,14 [0,115; 0,205] усл. ед. и 0,07 [0,05; 0,10] усл. ед. ($p < 0,001$), соответственно.

При прогрессировании ХСН важное значение имеет определение показателя соотношения позитивности экспрессии коллагенов I и III типов. После моделирования 8 недельной хронической ишемии сердца выявлено достоверно значимое снижение показателя соотношения позитивности экспрессии коллагенов I и III типов до 1,41 [1,02; 1,97] усл. ед. по сравнению с контрольными значениями, где показатель соотношения позитивности экспрессии коллагенов I и III типов составлял 2,25 [1,83; 3,75] усл. ед. ($p = 0,009$).

Заключение. В отдаленном периоде после моделирования хронической ишемии сердца в миокарде экспериментальных животных развиваются необратимые структурные изменения, сопровождающиеся расширением полей внеклеточного матрикса и уменьшением площади неповрежденного миокарда. Повышается жесткость сердечной мышцы за счет разрастания волокнистой соединительной ткани, которая образует плотный каркас вокруг пучков мышечных волокон и является причиной нарушения сократительной функции сердца. Структурные изменения сосудов микроциркуляторного русла, прогрессирование ЭД, мукоидное набухание, плазматическое пропитывание, липидная инфильтрация и отек сосудистых стенок указывают на развитие атеросклероза. Показано кардиопротекторное действие препаратов карведилола и валсартан/сакубитрила в восстановлении структурно-функциональной организации миокарда экспериментальных животных после моделирования у них хронической ишемии сердца на поздних этапах ее развития. Кардио- и ангиопротекторный эффекты данных препаратов направлены на уменьшение очагов заместительного фиброза миокарда и замедление структурного ремоделирования желудочков сердца, сокращение площадей отека и фиброза периваскулярных пространств миокарда.

Оценка иммуногистохимических маркеров повреждения сердечной мышцы TNNT2 и ACTN2 показала достоверное снижение позитивности их экспрессии у крыс с моделированной хронической ишемией сердца, что свидетельствует о разрушении белков сердечной мышцы и развитии структурно-функциональных нарушений миокарда. Хроническая ишемия сердца приводит к прогрессированию процесса заместительного фиброза миокарда, сопровождающегося повышением позитивности экспрессии коллагена I и коллагена III типов, снижением значения показателя соотношения позитивности экспрессии Col I и Col III относительно контрольных значений. Увеличение синтеза коллагена III типа в

интерстициальном пространстве миокарда у животных с хронической ишемией указывает на увеличение растяжимости внеклеточного матрикса и дилатацию камер сердца. Сочетанная терапия карведилолом и валсартан/сакубитрилом оказывает положительное влияние на восстановление структурной организации миокарда, способствует восстановлению позитивности экспрессии маркеров TNNT2 и ACTN2 в КМЦ сердечной мышцы, снижает выраженность позитивности экспрессии в миокарде маркера Col III.

Литература:

- [1]. Czubryt M.P., Hale T.M. Cardiac fibrosis: Pathobiology and therapeutic targets // *Cell Signal*. 2021. Vol. 85. P. 110066.
- [2]. Sverdlov A.L., Ngo D.T., Chan W.P. Aging of the nitric oxide system: are we as old as our NO? // *J. Am. Heart Assoc*. 2014. Vol. 3, N 4. P. e000973.
- [3]. Li M., Gao P., Zhang J. Crosstalk between Autophagy and Apoptosis: Potential and Emerging Therapeutic Targets for Cardiac Diseases // *Int. J. Mol. Sci*. 2016. V. 17. P. 332.
- [4]. Li L, Zhao Q, Kong W. Extracellular matrix remodeling and cardiac fibrosis // *Matrix Biol*. 2018. V. 68-69. P. 490–506.
- [5]. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimentation and other Scientific Purposes, N 123 of 18 March 1986; Protocol of Amendment to the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes, Strasbourg, 22 June 1998. URL: <https://rm.coe.int/168007a67b>
- [6]. Peng M., Yang M. et al. Huoxin Pill inhibits isoproterenol-induced transdifferentiation and collagen synthesis in cardiac fibroblasts through the TGF- β /Smads pathway // *Journal of Ethnopharmacology*. 2021. Vol. 275.
- [7]. Nordén E.S., Bendiksen B.A. et al. Sacubitril/valsartan ameliorates cardiac hypertrophy and preserves diastolic function in cardiac pressure overload // *ESC Heart Failure*. 2021. V. 8. P. 918–927.
- [8]. Watanabe K., Ohta Y. Low dose carvedilol inhibits progression of heart failure in rats with dilated cardiomyopathy // *British Journal of Pharmacology*. 2000. V. 130, P. 1489–1495.
- [9]. Леонова М.В. Эффективность применения сакубитрила/валсартана в лечении хронической сердечной недостаточности: обновленный обзор // *Медицинский совет*. 2023. Т. 17, № 16. С. 178–184.

S. A. NOVAKOVSKAYA, E. V. FEDOROVA, A.-M. V. YEROFEEVA, M. V. SIMONCHIK, A A. BASALAI

FEATURES OF THE STRUCTURAL ORGANIZATION OF THE MYOCARDIUM IN MODELING CHRONIC ISOPROTERENOL-INDUCED CARDIAC ISCHEMIA

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

Summary

Morphological data illustrating the dynamics of development of morpho-functional changes in the cardiac muscle and vessels of the microcirculatory bed of the rat heart during modeling of chronic myocardial ischemia at late stages of its development, which is accompanied by expansion of the extracellular matrix fields and a decrease in the area of intact myocardium, were obtained. The growth of fibrous connective tissue significantly increases the rigidity of the cardiac muscle and causes disruption of the contractile function of the heart.

Keywords: myocardium, cardiomyocytes, microcirculatory bed, ischemia, fibrosis.

С. Н. РЯБЦЕВА¹, М. А. КОРНЕЕВА¹, А. О. ЧЕБОТАРЬ¹, И. А. СЕМЁНИК¹,
А. Ю. ШАЛАБОВА¹, Д. И. ГОЛОВАЧ², В. М. КУНЦ²

КО-ЭКСПРЕССИЯ КОЛЛАГЕНА 1 И 3 ТИПОВ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ ГРЫЖЕВОГО МЕШКА И КОЖИ В ОБЛАСТИ ГРЫЖЕВОГО ВЫПАЧИВАНИЯ ПАЦИЕНТОВ РАЗНОГО ПОЛА

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

² Учреждение здравоохранения «6-я городская клиническая больница», г. Минск, Республика Беларусь

В ходе анализа характера экспрессии маркеров коллагена 1 и 3 типов в дерме кожи и фиброзной ткани грыжевого мешка пациентов с пупочной и паховой грыжей выявлены различия коллагенообразования среди мужчин и женщин, что указывает на необходимость коррекции послеоперационной реабилитации пациентов разного пола с данным заболеванием.

Ключевые слова: грыжа передней брюшной стенки, коллаген 1 типа, коллаген 3 типа, половые различия.

Введение. Значительный рост плановых и экстренных оперативных вмешательств на органах брюшной полости привели к увеличению числа пациентов с послеоперационными вентральными грыжами. Количество пациентов с послеоперационными вентральными грыжами увеличилось в 9 раз за последние 25 лет во всем мире. В настоящее время насчитывается более 200 способов и различных вариантов пластики грыжевых ворот передней брюшной стенки, которые выполняются в различных ведущих хирургических центрах во всем мире [1–2]. Однако несмотря на большое количество разработанных способов герниопластики, после аутопластики рецидивирование грыж наблюдается у 4,5–6 %, а после аллопластики – у 19,5 % пациентов. В то время как при наличии больших и гигантских послеоперационных вентральных грыжах частота рецидивов достигает 55 % [1–3]. На современном этапе в поиске решения проблемы рецидивирования вентральных грыж большое значение уделяется состоянию соединительной ткани и характеру коллагенообразования в процессах заживления поврежденных тканей и предоперационному состоянию тканей [4]. Было отмечено, что изменение соотношения коллагенов 1 и 3 типа влияет на регенерацию кожи и изменяет прочность соединительной ткани. Так, R.M. Blotta et al. считают, что выявленное снижение коллагенов 1 и 3 типа в соединительной ткани средней линии передней брюшной стенки является причиной развития диастаза прямых мышц живота у женщин [5]. F. Zhao et al. установили увеличение экспрессии коллагена 3 типа без изменения уровня экспрессии коллагена 1 типа в соединительной ткани сформированных послеоперационных грыж у пациентов после пластики колостомы [6]. Изменения соотношения коллагенов 1 и 3 типа также были отмечены после пластики грыжевых ворот с применением аллопротеза [7]. Проведенные исследования указывают на изменение коллагенообразования в соединительной ткани пациентов при формировании послеоперационных грыж. Однако нет данных о половых различиях коллагенообразования при формировании грыжевого выпячивания. Следовательно, изучение соотношения коллагенов 1 и 3 типа в соединительной ткани грыжевого мешка и кожи грыжевого выпячивания до операции у пациентов разного пола позволят оценить характер половых различий в коллагенообразовании соединительной ткани пациентов при формировании грыжевого выпячивания передней брюшной стенки.

Материалы и методы исследования. В исследование были включены 32 пациента, прооперированных в стационарах города Минска по поводу паховой или пупочной грыжи.

Для гистологического исследования удаленные мягкие ткани передней брюшной стенки (кожа, подкожно-жировая клетчатка, грыжевой мешок) фиксировали в 10 %-ом растворе нейтрального формалина. Далее выполнена вырезка материала, затем автоматическая проводка в гистологическом вакуумном процессоре карусельного типа KD-NS6B (KEDEE, Китай) с последующим заключением фрагментов тканей в парафиновые блоки. С помощью ротационного микротомы CUT56 (Slee Medical, Германия) готовили серийные срезы толщиной 4–5 мкм, проведено окрашивание гематоксилином и эозином по стандартной методике. Для проведения иммуногистохимического анализа срезы депарафинировали и регидратировали в спиртах нисходящей концентрации и ксилолах. Эндогенную пероксидазную активность блокировали с помощью Peroxide Block (3 % перекись водорода) в течение 10 мин, затем проводили демаскировку антигенов в цитратном буферном растворе pH = 6,0 (ab973, «Abcam», США) на водяной бане при 96 °C в течение 20 мин. В качестве первичных антител использовали: антитело к коллагену 1A2 типа («Elabscience», Китай, кат. № E-AB-10155, в рабочем разведении 1 : 400) и коллагену 3A1 типа («Elabscience», Китай, кат. № E-AB-22071, в рабочем разведении 1 : 400). Инкубацию с первичными антителами проводили в течение 30 минут во влажной камере в термостате при 32 °C. Для визуализации иммуногистохимической реакции нами была выбрана система детекции с использованием набора Mouse/Rabbit Uno Vue HRP/DAB Detection system (UMR1000PD, «Diagnostic BioSystems», США). Клеточные ядра докрашивали гематоксилином Майера в течение 13 минут. Препараты заключали в монтирующую среду Glasseal («Лабико», РФ). Микропрепараты были оцифрованы с помощью гистологического сканера MoticEasyScan One (Китай) на увеличении $\times 20,0$. Оценка экспрессии иммуногистохимических маркеров к коллагену 1 и 3 типов проводилась с помощью программного обеспечения анализа изображений Aperio ImageScope [v12.4.6.5003] и ее протокола «Positive Pixel Count», анализировалась позитивность выраженной экспрессии маркеров на увеличении $\times 20,0$ в 10-ти не перекрываемых полях зрения.

Статистическая обработка полученных данных выполнена с использованием пакета Statistica 10 (Statsoft Inc., США). Полученные морфометрические данные представлены в виде медианы и квартильных отклонений (Me (25%Q;75%Q)). Сравнение групп приводили с использование U-критерия теста Манна-Уитни (для двух независимых групп) и Т-критерий Вилкоксона (для двух зависимых групп). Вывод о статистической достоверности различий в группах делали при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. В исследование были включены как мужчины ($n = 25$), так и женщины ($n = 7$). Возраст пациентов варьировал от 24 до 78 лет, медиана возраста всех пациентов составила – 63,5 (56,0; 68,0) лет, мужчин – 63,0 (51,0; 68,0) года, женщин – 66,0 (62,0; 76,0) лет. У 13 (40,6 %) пациентов выполнена герниопластика по поводу пупочной грыжи, в 19 (59,4 %) – по поводу паховой грыжи. Среди женщин герниопластика пупочной грыжи с иссечением кожи, подкожно-жировой клетчатки и грыжевого мешка выполнена в 6 (85,7 %) случаях, паховой грыжи – у одной (14,3 %) пациентки. Среди мужчин пластика грыжевых ворот при развитии пупочной грыжи выполнена в 7 (28,0 %) случаях, паховой грыжи – у 18 (72,0 %) пациентов.

С учетом гистологической особенности соединительной ткани мужчин и женщин группы исследования были разделены по половому различию для дальнейшего изучения структуры соединительной ткани грыжевого мешка.

После герниопластики паховой грыжи операционный материал был представлен только тканью грыжевого мешка. Среди мужчин ($n = 18$) медиана позитивности маркера коллагена 1 типа в фиброзной ткани грыжевого мешка составила 11,5 (7,0; 15,0) %, коллагена 3 типа – 50,0 (44,0; 63,0) %. Соотношение экспрессии маркера коллагена 1 типа к маркеру коллагена 3 типа было равно 1:4,2. Позитивность коллагена 1 типа достоверно была ниже экспрессии маркера коллагена 3 типа ($p < 0,0001$, рисунок 1).

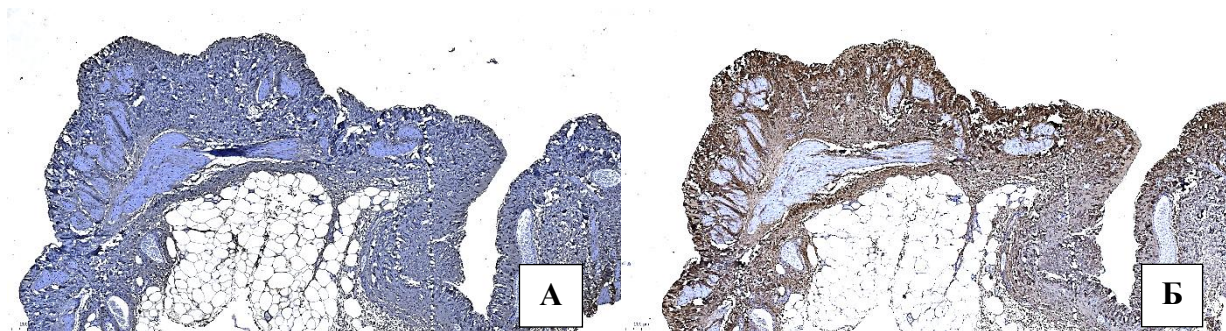


Рисунок 1. Характер экспрессии маркера коллагена 1 типа (А) и коллагена 3 типа (Б) в ткани грыжевого мешка пациентов мужского пола с паховой грыжей, иммуногистохимия, увеличение $\times 5,0$, шкала – 200 мкм

В анализируемой выборке только одна женщина была прооперирована по поводу паховой грыжи. В фиброзной ткани грыжевого мешка медиана позитивности маркера коллагена 1 типа составила 8,0 (6,0; 14,0) %, коллагена 3 типа – 9,0 (5,0; 30,0) %. Соотношение экспрессии маркера коллагена 1 типа к маркеру коллагена 3 типа было равно 1 : 1,13, без достоверных различий позитивности экспрессии оцениваемых белков ($p = 0,5205$, рисунок 2).

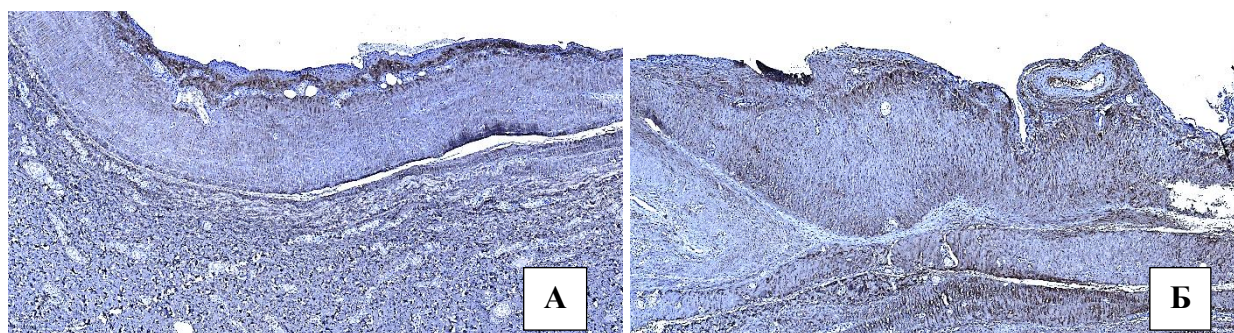


Рисунок 2. Характер экспрессии маркера коллагена 1 типа (А) и коллагена 3 типа (Б) в ткани грыжевого мешка пациента женского пола с паховой грыжей, иммуногистохимия, увеличение $\times 5,0$, шкала – 200 мкм

Таким образом, в ходе анализа соотношения экспрессии коллагенов 1 и 3 типа в фиброзной ткани грыжевого мешка паховой грыжи выявлены достоверные различия по половому признаку: развитие паховой грыжи у мужчин сопровождается нарастанием преимущественно синтеза коллагена 3 типа. В то время как для женщин более характерно увеличение синтеза обоих типов анализируемых коллагенов в соотношении 1 : 1,13. Данные изменения у обоих полов указывают на дисбаланс выработки коллагенов 1 и 3 типа в фиброзной ткани грыжевого мешка при формировании паховой грыжи.

После оперативной коррекции пупочной грыжи для исследования был доставлен комплекс мягких тканей передней брюшной стенки, представленный кожей, подкожно-жировой клетчаткой и грыжевым мешком. Анализ экспрессии маркеров коллагена 1 и 3 типа выполнен в участках кожи по краю резекции (неизменная часть), над грыжевым выпячиванием (измененная часть) и в фиброзной ткани грыжевого мешка.

Герниопластика грыжевых ворот пупочной грыжи выполнена у 7 пациентов мужского пола. В дерме кожи по краю резекции представленного комплекса мягких тканей передней брюшной стенки мужчин медиана выраженной экспрессии маркера коллагена 1 типа составила 2,0 (1,0; 2,0) %, коллагена 3 типа – 5,0 (5,0; 6,0) %. Соотношение выраженной экспрессии коллагена 1 типа к коллагену 3 типа было равно 1 : 2,5 ($p = 0,0022$, рисунок 3).

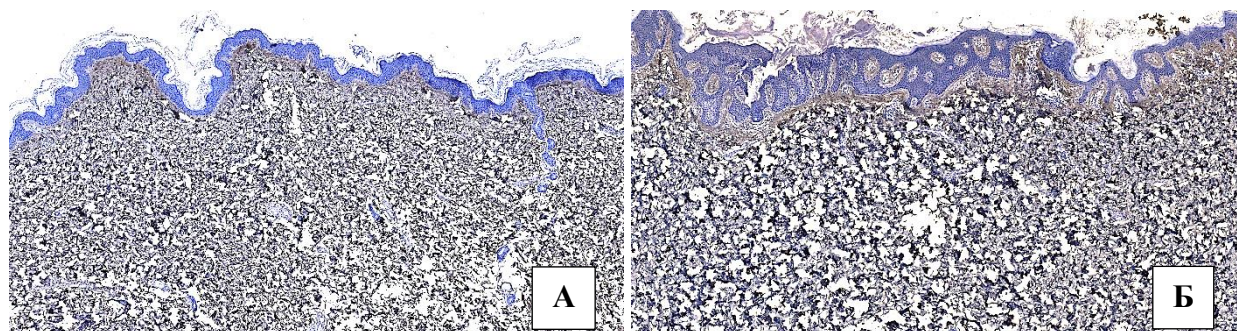


Рисунок 3. Характер экспрессии маркера коллагена 1 типа (А) и коллагена 3 типа (Б) в дерме кожи по краю резекции пупочной грыжи пациента мужского пола, иммуногистохимия, увеличение $\times 5,0$, шкала – 200 мкм

В дерме кожи над грыжевым выпячиванием медиана выраженной экспрессии маркера коллагена 1 типа составила 17,5 (9,0; 28,0) %, коллагена 3 типа – 8,0 (3,0; 10,0) %. Соотношение выраженной экспрессии коллагена 1 типа к коллагену 3 типа было равно 2,2 : 1,0 ($p = 0,0091$, рисунок 4).

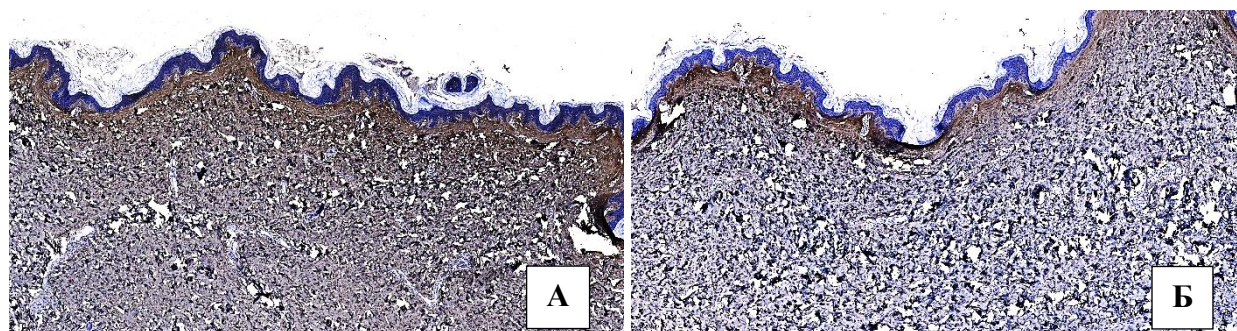


Рисунок 4. Характер экспрессии маркера коллагена 1 типа (А) и коллагена 3 типа (Б) в дерме кожи над грыжевым выпячиванием пупочной грыжи пациента мужского пола, иммуногистохимия, увеличение $\times 5,0$, шкала – 200 мкм

В фиброзной ткани грыжевого мешка пупочной грыжи также выявлена аналогичная закономерность: медиана выраженной экспрессии маркера коллагена 1 типа составила 33,5 (18,0; 50,0) %, коллагена 3 типа – 8,0 (3,0; 18,0) %. Соотношение выраженной экспрессии коллагена 1 типа к коллагену 3 типа было равно 4,2 : 1,0 ($p = 0,0091$). Изменение коллагенообразования в разных участках кожи пупочной грыжи достоверно отличались изменением экспрессии маркера коллагена 1 типа ($p = 0,0044$), без значимых изменений экспрессии коллагена 3 типа ($p = 0,5050$).

Выявленный характер экспрессии коллагена 1 и 3 типа в дерме кожи по краю резекции грыжевого выпячивания у мужчин с пупочной грыжей указывали на недостаточную регуляторную активность коллагена 3 типа и снижение формирования полноценных коллагеновых волокон 1 типа, что и явилось причиной образования грыжевого выпячивания вследствие снижения прочности дермы кожи в сочетании с другими этиологическими факторами. Нарастание экспрессии маркера коллагена 1 типа в дерме кожи над грыжевым выпячиванием и в фиброзной ткани грыжевого мешка пупочной грыжи указывали на включение компенсаторных механизмов активации синтеза данного коллагена при растяжении фиброзной ткани.

Герниопластика пупочной грыжи выполнена у шести женщин. В дерме кожи по краю резекции представленного комплекса мягких тканей передней брюшной стенки женщин медиана выраженной экспрессии маркера коллагена 1 типа составила 2,3 (2,0; 3,0) %, коллагена 3 типа – 8,0 (3,0; 18,0) %.

коллагена 3 типа – 8,6 (7,0; 10,0) %. Соотношение выраженной экспрессии коллагена 1 типа к коллагену 3 типа было равно 1:3,6 ($p = 0,0002$). В дерме кожи над грыжевым выпячиванием медиана выраженной экспрессии маркера коллагена 1 типа составила 12,5 (9,0; 14,0) %, коллагена 3 типа – 17,0 (12,0; 19,0) %. Соотношение выраженной экспрессии коллагена 1 типа к коллагену 3 типа было равно 1,0 : 1,4 ($p = 0,0640$). В фиброзной ткани грыжевого мешка пупочной грыжи также выявлена аналогичная закономерность: медиана выраженной экспрессии маркера коллагена 1 типа составила 22,5 (17,0; 34,0) %, коллагена 3 типа – 25,5 (19,0; 37,0) %. Соотношение выраженной экспрессии коллагена 1 типа к коллагену 3 типа было равно 1,0 : 1,1 ($p = 0,6501$). Изменение коллагенообразования в дерме кожи из разных участков в области пупочной грыжи достоверно отличались нарастанием экспрессии маркера коллагена 1 типа ($p = 0,0077$) и коллагена 3 типа ($p = 0,0044$).

Выявленный характер экспрессии коллагена 1 и 3 типов в дерме кожи по краю резекции грыжевого выпячивания у женщин с пупочной грыжей также указывали на недостаточную регуляторную активность коллагена 3 типа и снижение формирования полноценных коллагеновых волокон 1 типа. Нарастание экспрессии коллагенов 1 и 3 типа в соотношении практически 1:1 в фиброзной ткани грыжевого мешка указывало на нарушение синтеза полноценных молекул коллагена 1 типа у женщин с пупочной грыжей.

Заключение. В ходе исследования характера экспрессии маркеров коллагена 1 и 3 типов в дерме кожи и фиброзной ткани грыжевого мешка пациентов с пупочной и паховой грыжей выявлены различия коллагенообразования среди мужчин и женщин: у женщин наблюдалась активация синтеза обоих коллагенов в фиброзной ткани грыжевого мешка как при развитии паховой грыжи (соотношение экспрессии коллагена 1 типа к коллагену 3 типа составило 1 : 1,1, $p = 0,5205$), так и пупочной грыжи (соотношение экспрессии коллагена 1 типа к коллагену 3 типа составило 1 : 1,1, $p = 0,6501$). Следовательно, у пациентов женского пола с формированием грыж в соединительной ткани мягких тканей передней брюшной стенки и кожи наблюдается нарушение синтеза коллагена 3 типа, что сопровождается изменением формирования коллагена 1 типа и способствует нарушению прочности кожи и соединительной ткани.

У лиц мужского пола при развитии паховой грыжи отмечена активация синтеза коллагена 3 типа (соотношение экспрессии коллагена 1 типа к коллагену 3 типа составило 1 : 4,2, $p = 0,0002$), при развитии пупочной грыжи – активация синтеза коллагена 1 типа (соотношение экспрессии коллагена 1 типа к коллагену 3 типа составило 4,2 : 1,0, $p = 0,0028$) в фиброзной ткани грыжевого мешка. Полученные данные указывают на различия коллагенообразования у лиц мужского пола в области мезогастрия передней брюшной стенки и паховой области. В соединительной ткани передней брюшной стенки мужчин наблюдалась активация синтеза коллагена 3 типа с нарушением синтеза коллагена 1 типа. В паховой области – активный синтез коллагена 1 типа не обеспечивал должную плотность соединительной ткани, что способствовало развитию грыжи.

Выявленные данные характера коллагенообразования при развитии грыж указывают на необходимость коррекции в послеоперационной реабилитации пациентов разного пола с данным заболеванием.

Исследование выполнено при финансировании Белорусским фондом фундаментальных исследований (договор M23УЗБ-017 от 20.11.2023 г. «Оценка риска развития рецидива после пластики вентральных грыж в зависимости от особенностей соединительной ткани и кожи пациентов»).

Литература:

- [1]. Чарышкин А.Л., Фролов А.А. Общий взгляд на технологии профилактики и лечения пациентов с послеоперационными вентральными грыжами / Ульяновский медико-биологический журнал. 2015. № 2. С. 39–46.

- [2]. Е.Е. Лукьянычев и др. Общий взгляд на технологии профилактики и лечения пациентов с послеоперационными вентральными грыжами // Исследования и практика в медицине. 2021. Т. 8, № 3. С. 84–96.
- [3]. B. Cirocchi et al. Comparison of Hernia Sac Transection and Full Sac Reduction for the Treatment of Inguinal Hernias: A Systematic Review and Meta-Analysis of Clinical Trials // World J Surg. 2025. Vol. 49. № 3. P. 590–604.
- [4]. Д.И. Головач и др. Динамика реактивных изменений тканей передней брюшной стенки при имплантации полипропиленовой сетки, обработанной обогащенной тромбоцитами плазмой // Хирургия. Восточная Европа. 2022. Т. 11. № 4. С. 546–557.
- [5]. R.M. Blotta et al. Collagen I and III in women with diastasis recti // Clinics. 2018. Vol. 73, Art. e319. P. 1–5.
- [6]. F. Zhao et al. Decrease collagen type III synthesis in skin fibroblasts is associated with parastomal hernia following colostomy // International journal of molecular medicine. 2019. Vol. 44. P. 1609–1618.
- [7]. K. Jungle et al. Decrease collagen type I/III ratio in patients with recurring hernia after implantation // Langenbecks Arch Surg. 2004. Vol. 389. P. 17–22.

S. N. RJABCEVA¹, M. A. KORNEEVA¹, A. O. CHABATAR¹, I. A. SIAMIONIK¹, A. YU. SHALABODOVA¹, D. I. GALAVACH², V. M. KUNZ²

CO-EXPRESSION OF COLLAGEN TYPE 1 AND 3 IN CONNECTIVE TISSUE OF THE HERNIAL SAC AND SKIN IN THE AREA OF HERNIAL PROCESSING IN PATIENTS OF DIFFERENT GENDER

¹ State Scientific Institution "Institute of Physiology of National Academy of Sciences of Belarus",
Minsk, Republic of Belarus

² Healthcare Institution "6th City Clinical Hospital", Minsk, Republic of Belarus

Summary

We analyzed the expression pattern of collagen type 1 and 3 in the dermis of the skin and fibrous tissue of the hernial sac of patients with umbilical and inguinal hernia. Differences in collagen formation were revealed among men and women, which indicates the need for correction of postoperative rehabilitation of patients of different sexes with this disease.

Keywords: hernia of the anterior abdominal wall, collagen type 1, collagen type 3, gender difference.

С. В. ВАСИЛЕВИЧ¹, Е. А. ДЕМИДИК², А. С. ЛЮЛЯ¹, Е. А. МАРКОВА¹, С. В. ФЕДОРОВИЧ¹

ДЕЙСТВИЕ КОРОТКОЦЕПОЧЕЧНЫХ ЖИРНЫХ И ПИРОВИНОГРАДНОЙ КИСЛОТ НА ОБРАЗОВАНИЕ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В ГОМОГЕНАТАХ МОЗГА И ПЕЧЕНИ КРЫС

¹ Белорусский государственный университет, г. Минск, Республика Беларусь

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

Работа нейронов головного мозга в значительной степени может регулироваться микробиотой кишечника. Мессенджерами такой регуляции могут быть короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК), прежде всего пропионовая и масляная кислота, синтезируемые микроорганизмами. В представленной работе мы изучили их действие и действие близкой по структуре пировиноградной кислоты на образование продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в гомогенатах печени и мозга крыс. Также нами было исследовано влияние КЦЖК на образование свободных радикалов в синапсосах мозга с помощью флуоресцентного зонда DCFDA. Установлено, что 100 мкМ масляной кислоты вызывают увеличение базального уровня ПОЛ в гомогенате мозга; 10 мкМ, 100 мкМ пропионовой кислоты и 500 мкМ масляной кислоты уменьшают этот же показатель в гомогенате печени. Масляная кислота (50 мкМ и 5 мМ), также, как и пировиноградная кислота в концентрации 50 мкМ, не влияет на образование свободных радикалов в гомогенатах обоих органов, индуцированное 50 мкМ Fe^{2+} + 1 мМ H_2O_2 . Пропионовая кислота (50 мкМ и 5 мМ) увеличила накопление продуктов ПОЛ в случае реакции Фентона в гомогенате мозга и уменьшила в гомогенате печени. 5 мМ пировиноградной кислоты уменьшили этот же показатель в гомогенатах печени и мозга. Масляная кислота (50 мкМ) не влияла на образование свободных радикалов в синапсосах мозга. Пропионовая кислота (50 мкМ) уменьшила накопление активных форм кислорода в синапсосах, индуцированное 1 мМ H_2O_2 . Таким образом, показано, что КЦЖК и пировиноградная кислота способны регулировать окислительный стресс в мозге и печени.

Ключевые слова: микробиота, пропионовая кислота, масляная кислота, пировиноградная кислота, головной мозг, перекисное окисление липидов.

Введение. Работа нейронов головного мозга в значительной степени может регулироваться микробиотой кишечника [1–3]. Взаимодействие между кишечником и мозгом активно изучается, в настоящее время обсуждается существование оси микробиота-кишечник-мозг [1–3]. Мессенджерами такой регуляции могут быть короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК), прежде всего пропионовая и масляная кислота, синтезируемые микроорганизмами [1–3]. Механизм воздействия КЦЖК на клетки головного мозга достаточно сложен и не до конца изучен. Наряду с активацией специфических рецепторов [2–4] он включает в себя регуляцию образования свободных радикалов [5]. Ранее нами было показано, что пропионовая кислота чаще оказывает антиоксидантное действие, а масляная кислота – прооксидантное действие в гомогенатах мозга и печени [6]. В то же время конкретный эффект увеличения или снижения образования продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) зависел от концентрации КЦЖК и органа [6]. В своей предыдущей работе мы изучали влияние миллимолярных патофизиологических концентраций, соответствующих пропионовой ацидурии или моделированию аутизма [3, 6, 7]. В то же время в физиологических условиях уровень КЦЖК в крови составляет порядка 5–20 мкМ [2, 3]. Поэтому в данной статье мы изучили влияние пропионовой и масляной кислот на образование продуктов перекисного окисления липидов в гомогенатах печени и мозга как в больших концентрациях, так и в микромолярном диапазоне.

Остаются неизвестными молекулярные механизмы действия КЦЖК на образование и распад активных форм кислорода (АФК). Показано, что структурно близкая к КЦЖК пировиноградная кислота обладает антиоксидантными свойствами за счет связывания пероксида водорода [8, 9]. Поэтому мы также изучили действие пропионовой, масляной и пировиноградной кислот на образование продуктов ПОЛ в присутствии H_2O_2 . Следует отметить, что, в отличие от других тестов на окислительный стресс, в случае ПОЛ пероксид водорода вызывает увеличение накопления продукта только в присутствии Fe^{2+} [6]. По этой причине процесс ПОЛ в наших экспериментах инициировался реактивом Фентона ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+}$).

Материалы и методы исследования. В работе использованы реактивы: 2'7'-дихлордигидрофлуоресцеин диацетат (DCFDA), пропионовая и масляная кислота ("Sigma", США). Все остальные реактивы квалификации не ниже "осч".

Получение гомогената. Гомогенат получали из печени и мозга беспородных белых крыс самцов весом 150–180 грамм, находящихся на стандартном рационе вивария БГУ. Извлекали печень и мозг подопытных животных и два раза промывали в ледяном 0,1 М натрий-фосфатном буфере pH 7,4. Ткани измельчали ножницами в чашке Петри, стоящей на льду и делали навеску 1 г. Гомогенизацию проводили в гомогенизаторе Поттера с притертым тефлоновым пестиком, предварительно добавив 4 мл 0,1 М натрий-фосфатного буфера pH 7,4 и ещё 5 мл через 30 с. Таким образом, мы получали 10 % гомогенат, который сразу же фильтровали через 3–4 слоя марли. В экспериментах с КЦЖК и пировиноградной кислотой соответствующие вещества вносились в фосфатный буфер и гомогенат инкубировался с ними 30 мин. при 37 °C до измерения продуктов ПОЛ.

Получение синапсом. Синапсомы изолировали из полушарий мозга крыс дифференциальным центрифугированием по методу Хайюша [10]. Полученный осадок суспендировали в инкубационной среде следующего ионного состава (в mM): NaCl 132; KCl 5; MgCl_2 1,3; NaH_2PO_4 1,2; глюкоза 10; HEPES 15; pH 7,4. При регистрации флуоресценции в инкубационную среду добавляли 1 mM CaCl_2 . Суспензию синапсом (10–20 мг/мл белка) предынкубировали 30 мин. при 37 °C, после чего её ставили на лед и использовали в эксперименте в течение 3 ч. В экспериментах с изучением действия КЦЖК 50 мкМ соответствующих кислот дополнительно вносились в инкубационную среду перед инкубацией.

Определение уровня ПОЛ. Уровень ПОЛ определяли по накоплению продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) [11]. Нами использовались две модификации метода. Согласно первой модификации [6], готовый 10 % гомогенат печени или мозга разводили в натрий-фосфатном буфере до конечной концентрации белка 0,8–1 мг/мл. К 1 мл разведённого гомогената добавляли 1 мл 0,1 М Na-фосфатного буфера (pH 7,4), 0,5 мл 30 % раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ), 2 мл 0,8 % раствора ТБК. Пробы помещали на 15 мин в кипящую водную баню, выпавший в осадок белок отделяли центрифугированием в течении 10 мин при 1500–3000 об/мин. Полученный супернатант спектрофотометрировали при длине волны 532 нм. Согласно второй модификации [12], нами была пропущена стадия центрифугирования, но измерялась разница в оптической плотности при 532 нм и 560 нм.

Определение накопления свободных радикалов в синапсоммах. Для определения образования свободных радикалов в синапсоммах использовали флуоресцентный зонд DCFDA [13, 14]. К суспензии синапсом (15–20 мг белка/мл) добавляли зонд DCFDA до конечной концентрации 25 мкМ. Инкубировали 60 мин при 37 °C. Загруженные синапсомы однократно отмывали в десятикратном объеме инкубационной среды. Осадок суспендировали в 2–2,5 мл инкубационной среды и использовали в экспериментах.

Флуоресценцию измеряли на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian, США) при постоянном помешивании в термостатируемой кювете (37 °C) при $\lambda_{\text{возб/рег}} = 501/525$ нм.

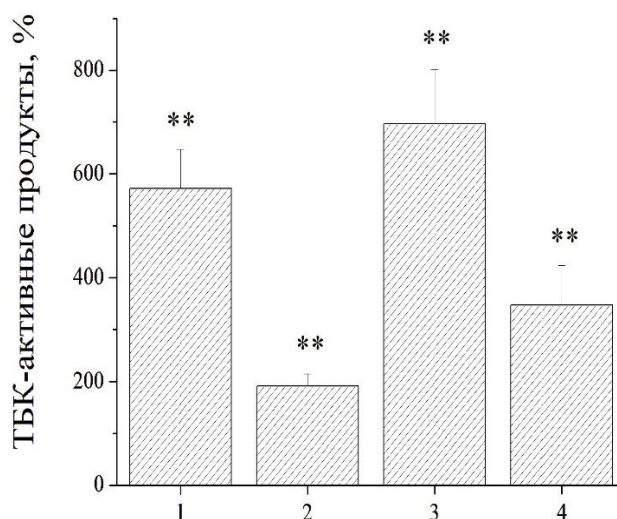
К 1,8 мл инкубационной среды, содержащей 2 mM CaCl_2 , добавляли 200 мкл суспензии синапсом до конечной концентрации белка 1 мг/мл. В случае экспериментов с КЦЖК инкубационная среда также содержала 50 мкМ соответствующей кислоты. Через 50 с после начала регистрации сигнала вносили 1 mM H_2O_2 . В контрольном эксперименте в

кювету добавляли аналогичное количество воды. В дальнейшем из опытной кривой вычитали контрольную кривую.

Белок определяли с помощью метода Лоури [15] с использованием бычьего сывороточного альбумина как стандарта.

Статистическая обработка производилась с помощью программы Origin 6.0. Результаты представляли в виде среднего арифметического индивидуальных измерений и стандартной ошибки средней арифметической. Если сравнивалось более, чем 2 группы, то использовался дисперсионный анализ (ANOVA) с посттестом Бонферрони.

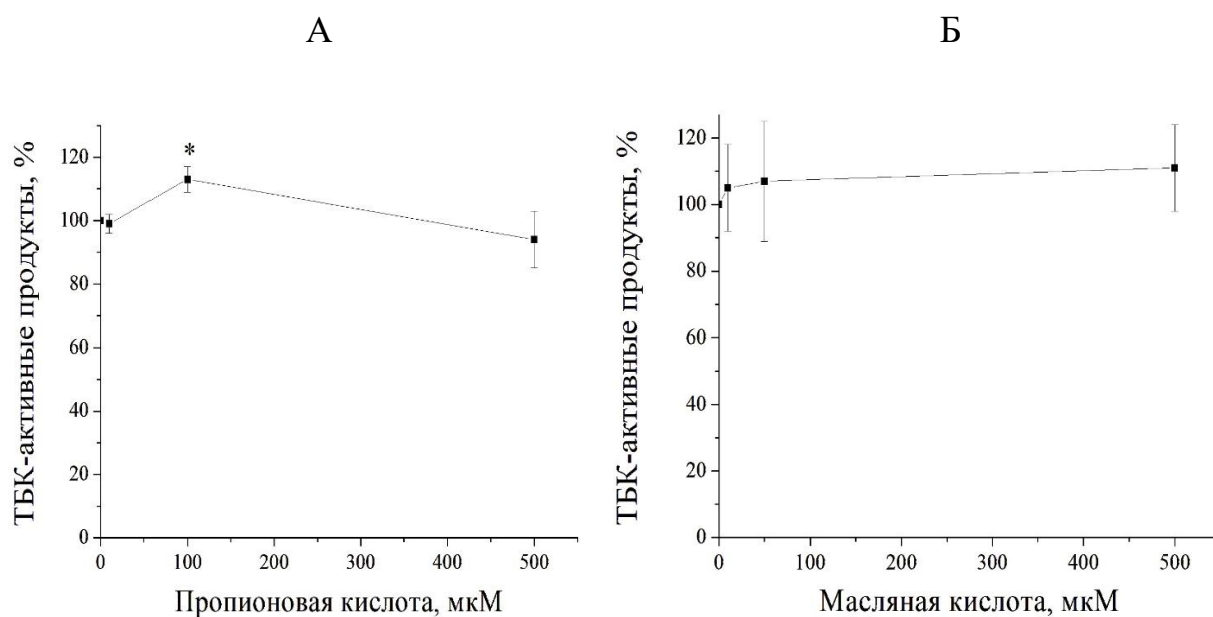
Результаты и их обсуждение. На первом этапе мы убедились, что обе модификации методики определения продуктов ПОЛ с ТБК достаточно эффективны. Вариант без центрифугирования ранее использовался нами только для синапсом. Рисунок 1 показывает, что инкубация гомогенатов с реактивом Фентона в зависимости от органа приводит к увеличению накопления ТБК-активных продуктов в 2–6 раз. Удаление стадии центрифугирования несколько увеличивает амплитуду ответов на стимуляцию образования АФК (рисунок 1), что позволяет предположить потерю окрашенных продуктов при осаждении. Таким образом, без стадии центрифугирования можно обойтись, что сокращает время эксперимента и позволяет избежать амортизации дорогостоящего оборудования.



- 1 – Гомогенат мозга, определение ТБК-активных продуктов с стадией центрифугирования
 2 – Гомогенат печени, определение ТБК-активных продуктов с стадией центрифугирования
 3 – Гомогенат мозга, определение ТБК-активных продуктов без стадии центрифугирования
 4 – Гомогенат печени, определение ТБК-активных продуктов без стадии центрифугирования
 За 100 % взят уровень малонового диальдегида без добавки 50 мкМ Fe^{2+} + 1 мМ H_2O_2 и составивший $2,11 \pm 0,38$ мкМ/мг белка в гомогенате мозга и $1,48 \pm 0,15$ мкМ/мг белка в гомогенате печени
 Представлены средние значения 10 экспериментов $\pm$ Sx
 ** $p \leq 0,01$ по отношению к 100 %

Рисунок 1. Увеличение накопления продуктов ПОЛ в гомогенатах мозга и печени при добавлении 50 мкМ Fe^{2+} + 1 мМ H_2O_2 , измеренное различными модификациями метода

Далее мы изучили действие микромолярных концентраций КЦЖК на образование продуктов ПОЛ в гомогенате мозга и печени. Рисунок 2 и 3 показывают, что, как и в случае миллимолярных концентраций [6] эффект соединений не был линейным, он зависел от органа и конкретной дозы. Мы показали, что прооксидантным эффектом обладает 100 мкМ масляной кислоты для мозга, а антиоксидантным – 10 мкМ и 100 мкМ пропионовой кислоты, а также 500 мкМ масляной кислоты для печени. Следует отметить, что биологическое действие достаточно небольшой концентрации (10 мкМ) пропионовой кислоты позволяет предположить рецепторный механизм действия [2–4].

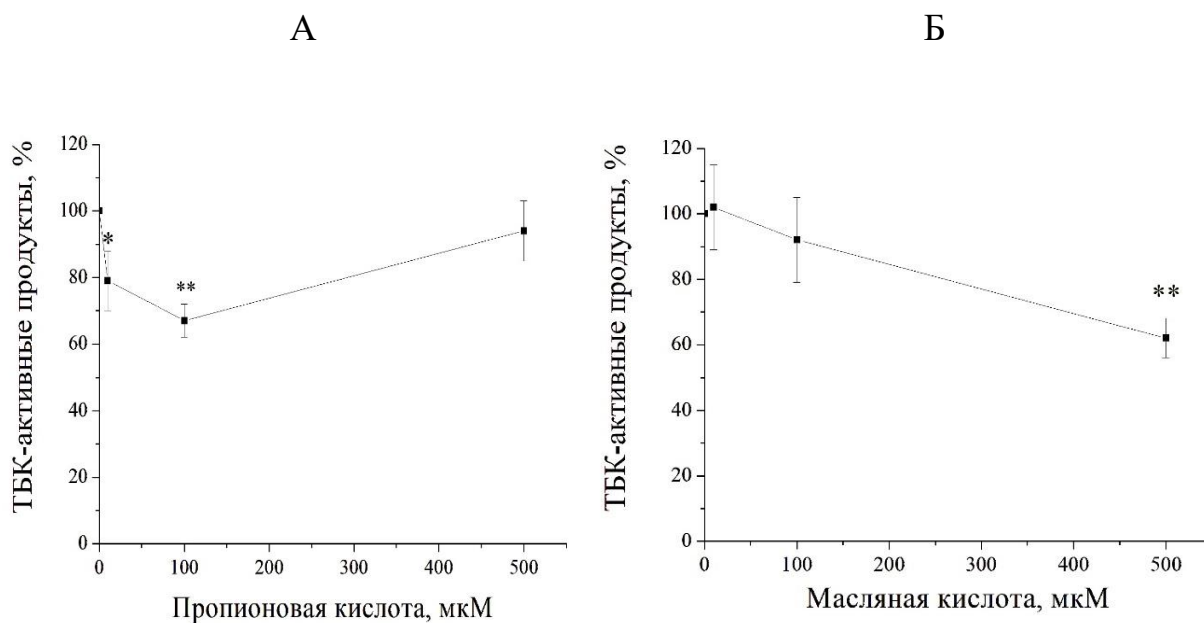


За 100 % взят уровень малонового диальдегида в гомогенате без КЦЖК и составивший $2,11 \pm 0,38$ мкМ/мг белка

Представлены средние значения 8 экспериментов $\pm Sx$

* $p \leq 0,05$ по отношению к 100 %

Рисунок 2. Влияние пропионовой (А) и масляной (Б) кислоты на уровень продуктов ПОЛ в гомогенате мозга



За 100 % взят уровень малонового диальдегида в гомогенате без КЦЖК и составивший $1,48 \pm 0,15$ мкМ/мг белка

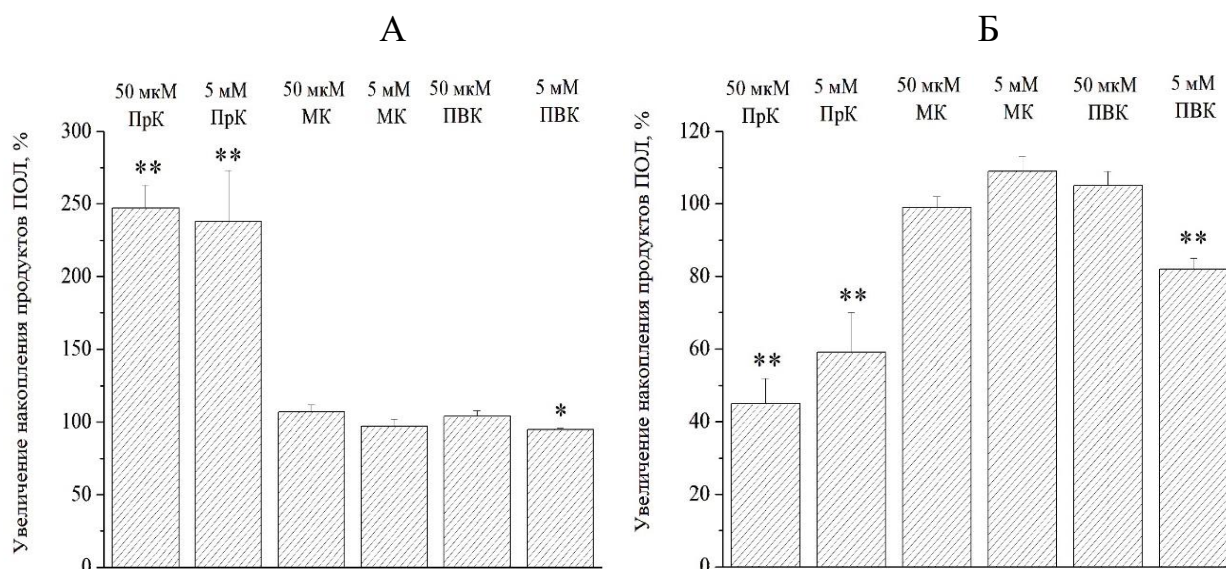
Представлены средние значения 8 экспериментов $\pm Sx$

** $p \leq 0,01$ по отношению к 100 %

Рисунок 3. Влияние пропионовой (А) и масляной (Б) кислоты на уровень продуктов ПОЛ в гомогенате печени

На следующем этапе мы изучили действие КЦЖК на прирост продуктов ПОЛ, вызванный добавлением в гомогенат смеси 50 мкМ Fe^{2+} и $1 \text{ мМ H}_2\text{O}_2$. Так как одним из механизмов потенциального ингибирующего действия КЦЖК является связывание с

пероксидом водорода, в этой экспериментальной серии мы также изучили влияние пирувата, хорошо известного естественного скавенджера H_2O_2 [8, 9]. Рисунок 4 показывает, что масляная кислота не оказывает никакого влияния в данной экспериментальной модели, в то же время пропионовая кислота обладает антиоксидантным действием в гомогенате печени и прооксидантным действием в гомогенате мозга. Этот эффект был практически одинаков для физиологической концентрации 50 мкМ и патофизиологической концентрации 5 мМ. Пируват обладает антиоксидантным действием в обоих гомогенатах в концентрации 5 мМ, но был неэффективен в концентрации 50 мкМ (рисунок 4).



ПрК – гомогенат был предынкубирован с пропионовой кислотой

МК – гомогенат был предынкубирован с масляной кислотой

ПБК – гомогенат был предынкубирован с пировиноградной кислотой

За 100 % взят уровень малонового диальдегида после добавления 50 мкМ Fe^{2+} + 1 мМ H_2O_2 и составивший $4,13 \pm 0,77$ мкМ/мг белка в гомогенате мозга и $2,90 \pm 0,22$ мкМ/мг белка в гомогенате печени

Представлены средние значения 10 экспериментов $\pm$ Sx

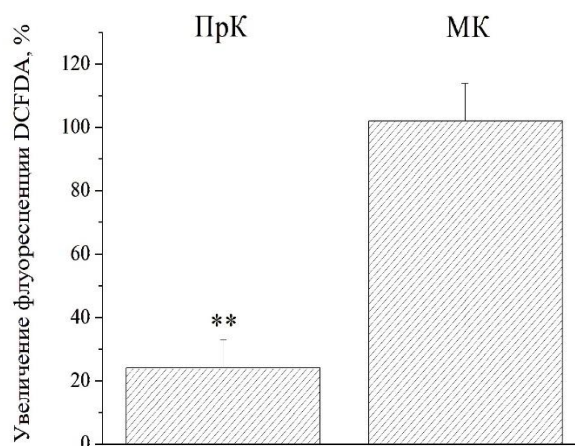
** $p \leq 0,01$ по отношению к 100 %

* $p \leq 0,05$ по отношению к 100 %

Рисунок 4. Влияние короткоцепочечных жирных и пировиноградной кислоты на увеличение накопление продуктов ПОЛ, индуцированное 50 мкМ Fe^{2+} + 1 мМ H_2O_2 в гомогенатах мозга (а) и печени (б)

Разнонаправленность действия пропионовой кислоты в разных органах можно объяснить предположением, что это соединение обладает как прооксидантными, так и антиоксидантными свойствами, и в зависимости от того, какая тенденция окажется сильнее, таким и будет конечный эффект. В мозге одним из основных источников АФК является NADPH-оксидаза микроглиальных клеток [16]. Показано, что микроглиальные клетки могут активироваться КЦЖК, в том числе и пропионовой кислотой [17, 18], что, в свою очередь, может привести к усилению образования свободных радикалов. Поэтому на следующем этапе мы изучили действие КЦЖК на развитие окислительного стресса в синапсосомах, изолированных пресинаптических окончаний нейронов. Этот объект сохраняет многие свойства интактных пресинаптических окончаний и не содержит микроглиальные клетки [10, 19]. При работе с синапсосомами мы использовали флуоресцентный зонд DCFDA, так как этот метод более чувствителен по сравнению с определением ТБК-активных продуктов [12, 20]. Также мы в данном случае использовали 1 мМ H_2O_2 без дополнительной добавки ионов железа. Это связано с тем, что в этом тесте, в отличие от теста с ТБК-продуктами, где отсутствует ответ на один пероксид водорода [6], 1 мМ H_2O_2 дает значимый сигнал, который легко может быть измерен [20]. 50 мкМ Fe^{2+} + 1 мМ H_2O_2 приводит к очень быстрому

окислению флуоресцентного зонда внутри синапсом [20], что делает затруднительным его изучение. Рисунок 5 показывает, что 50 мкМ пропионовой, но не масляной кислоты обладает антиоксидантными свойствами в этой экспериментальной модели. Полученные результаты в целом подтверждают гипотезу об прооксидантном действии пропионовой кислоты на микроглиальные клетки, которое маскирует ее антиоксидантное действие. Остается неизвестным механизм, позволяющий этому соединению подавлять окислительный стресс, вызванный пероксидом водорода или пероксидом водорода + Fe^{2+} .



ПрК – синапсомы были предынкубированы с 50 мкМ пропионовой кислоты. Инкубационная среда также содержала 50 мкМ пропионовой кислоты

МК – синапсомы были предынкубированы с 50 мкМ масляной кислоты. Инкубационная среда также содержала 50 мкМ масляной кислоты

Представлены средние значения 6 экспериментов $\pm$ Sx.

** $p \leq 0,01$ по отношению к 100 %

Рисунок 5. Влияние КЦЖК на увеличение флуоресценции DCFDA в синапсомы мозга крыс

Закключение. Таким образом, нами показано, что даже в микромолярных концентрациях КЦЖК способны оказывать влияние на свободнорадикальные процессы в гомогенатах мозга и печени. Пропионовая кислота способна активировать окислительный стресс, индуцированный $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$ в гомогенате мозга и ингибировать его в гомогенате печени. Пропионовая кислота также обладает антиоксидантными свойствами в модели окисления флуоресцентного зонда DCFDA в синапсомы с помощью пероксида водорода. Пировиноградная кислота снижала накопление продуктов ПОЛ, вызванное $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$ в гомогенатах печени и мозга.

Литература:

- [1]. Cryan J.F., O’Riordan K.J., Cowan C.S.M. et al. The microbiota-gut-brain axis // *Physiol Rev.* 2019. Vol. 99. P. 1877–2013.
- [2]. Dalile B., Van Oudenhove L., Vervliet B. et al. The role of short-chain fatty acids in microbiota-gut-brain communication // *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2019. Vol. 26. P. 461–478.
- [3]. Люля А.С., Федорович С.В. Роль короткоцепочечных жирных кислот в функционировании оси микробиота-кишечник-головной мозг // *Экспериментальная биология и биотехнология.* 2024. N. 1. С. 77–85.
- [4]. Kimura I., Ichimura A., Ohus-Kitano R. et al. Free fatty acid receptors in health and disease // *Physiol Rev.* 2020, Vol. 100. P. 171–210.
- [5]. Gonzalez-Bosch C., Boorman E., Zunszain P.A. et al. Short-chain fatty acids as modulators of redox signaling in health and disease // *Redox Biol.* 2021. Vol. 47. Art. 102165.
- [6]. Яцкевич Е.А., Джавад М., Федорович С.В. Влияние пропионовой и масляной кислот на перекисное окисление липидов в гомогенатах печени и мозга крыс // *Экспериментальная биология и биотехнология.* 2023. N 1. С. 26–32.

- [7]. Haijes H.A., Jans J.J.M., Tas S.Y. et al. Pathophysiology of propionic and methylmalonic acedimias. Part 1, Complications // *J Inherit Metab Dis*. 2019. Vol. 42. P. 730–744.
- [8]. Lopalco A., Dalwadi G., Niu S. et al. Mechanism of decarboxylation of pyruvic acid in the presence of hydrogen peroxide // *J Pharm Sci*. 2016. Vol. 105. P. 705–713.
- [9]. Guarino V.A., Oldham W.M., Loscalzo J. et al. Reaction rate of pyruvate and hydrogen peroxide: assessing antioxidant capacity of pyruvate under biological conditions // *Sci Rep*. 2019. Vol. 9. Art. 19568.
- [10]. Hajos F. An improved method for the preparation of synaptosomal fractions in high purity // *Brain Res*. 1975. Vol. 93. P. 485–489.
- [11]. Kohn H.I., Liversedge M. On a new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, emetine, ergotamine, epinephrine, and menadione // *J Pharmacol Exp Ther*. 1944. Vol. 82. P. 292–300.
- [12]. Лыскова Т.И., Аксенцев С.Л., Федорович С.В. и др. Влияние факторов ишемического повреждения на перекисное окисление липидов в синапсоммах мозга крыс // *Биофизика*. 1997. Т. 42. С. 408–411.
- [13]. LeBel C.P., Bondy S.C. Sensitive and rapid quantitation of oxygen reactive species formation in rat synaptosomes // *Neurochem Int*. 1990. Vol. 17, P. 435–440.
- [14]. Alekseenko A.V., Waseem T.V., Fedorovich S.V. Ferritin, a protein containing iron nanoparticles, induces reactive oxygen species formation and inhibits glutamate uptake in rat brain synaptosomes // *Brain Res*. 2008. Vol. 1241, P. 193–200.
- [15]. Lowry O., Rosebrough H., Farr H. et al. Protein measurements with Folin reagent // *J Biol Chem*. 1952. Vol. 193. P. 265–279.
- [16]. Block M.L., Zecca L., Hong J.-S. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms // *Nature Rev Neurosci*. 2007. Vol. 8. P. 57–69.
- [17]. Huuskonen J., Suuronen T., Nuutinen T. et al. Regulation of microglial response by sodium butyrate and short-chain fatty acids // *Br J Pharmacol*. 2004. Vol. 141. P. 874–880.
- [18]. Sampson T.R., Debelius J.W., Thron T. et al. Gut microbiota regulate motor deficits and neuroinflammation in a model of Parkinson's disease // *Cell*. 2016. Vol. 167. P. 1469–1480.
- [19]. Федорович С.В., Демидчик В.В. Повреждение синапсов центральной нервной системы при патологиях головного мозга: мембранные механизмы и способы коррекции // *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2023. N 3. С. 4–11.
- [20]. Пекун Т.Г., Васим Т.В., Федорович С.В. Образование активных форм кислорода при экстраклеточном закислении // *Биофизика*. 2012. Т. 57. С. 253–257.

S. V. VASILEVICH¹, E. A. DEMIDIK², A. S. LYULYA¹, E. A. MARKOVA¹, S. V. FEDOROVICH¹

EFFECT OF SHORT CHAIN FATTY AND PYRUVIC ACID ON OXIDATIVE STRESS DEVELOPMENT IN RAT BRAIN AND LIVER HOMOGENATES

¹ Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

² Educational Establishment "Belarusian State Medical University", Minsk, Republic of Belarus

Summary

The functioning of brain neurons is largely regulated by gut microbiota. Short chain fatty acid (SCFA), mainly propionic and butyric acid, which are synthesized by microorganisms, can be messengers of this regulation. In present paper we investigate their influence and structurally close pyruvic acid on formation of lipid peroxidation (LP) products in rat liver and brain homogenates. Also, we study influence of SCFA on free radical formation in brain synaptosomes using DCFDA fluorescent dye. It is established that 100 μM of butyric acid leads to increase of LP basal level in brain homogenates; 10 μM , 100 μM of propionic acid and 500 μM of butyric acid decrease the same characteristic in liver homogenates. Butyric acid (50 μM and 5 mM) and also pyruvic acid in concentration 50 μM did not influence free radical formation induced by 50 μM Fe^{2+} + 1 mM H_2O_2 in homogenates of both tissues. Propionic acid (50 μM and 5 mM) increased the accumulation of LP products in case of Fenton reaction in brain homogenates and decrease it liver homogenates. Butyric acid (50 μM) did not influence free radical formation in brain synaptosomes. Propionic acid (50 μM) decreased reactive oxygen species formation in synaptosomes which was induced by 1 mM H_2O_2 . Therefore, it was shown that SCFA and pyruvic acid able to regulate oxidative stress in brain and liver.

Keywords: microbiota, propionic acid, butyric acid, brain, lipid peroxidation, pyruvic acid.

Д. В. ТАПАЛЬСКИЙ, М. В. СИМОНЧИК, Е. В. КАРПОВА

ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ СЕЛЕКТИВНОЙ ДЕКОНТАМИНАЦИИ КИШЕЧНИКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОДНОКАМЕРНОЙ ДИНАМИЧЕСКОЙ ПРОТОЧНОЙ СИСТЕМЫ

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

Сконструирована, собрана и откалибрована динамическая проточная система, моделирующая в режиме реального времени пероральное поступление антибиотиков в кишечник и их постепенную элиминацию. Выполнено моделирование энтерального введения колистина и рифампицина. При сопоставлении расчетных моделируемых концентраций рифампицина и его концентраций, фактически создаваемых динамичной проточной системой, получены совпадающие кинетические профили.

Ключевые слова: фармакокинетика, антибиотики, моделирование, деконтаминация кишечника.

Введение. Инфекционные осложнения после трансплантации печени, кардиохирургических вмешательств, операций на органах желудочно-кишечного тракта, а также у пациентов отделений реанимации и интенсивной терапии представляют серьезную угрозу для жизни, так как в значительной степени способствуют увеличению продолжительности госпитализации и являются основной причиной летальных исходов в этот период [1]. С учетом особенностей патогенеза разнообразных критических состояний, при которых происходит транслокация микроорганизмов эндогенной микробиоты, которая часто становится этиологическим фактором микробных осложнений, применяют различные режимы антимикробной терапии и антибиотикопрофилактики. Одним из методов антибиотикотерапии является метод селективной деконтаминации кишечника (СДК). Данный метод представляет собой профилактическую стратегию, состоящую из введения противомикробных препаратов для уменьшения количества факультативно анаэробных грамотрицательных бактерий в кишечнике и предотвращения инфекций, вызываемых этими микроорганизмами при транслокации за пределы желудочно-кишечного тракта [2].

В многочисленных клинических исследованиях было показано, что применение СДК позволяет проводить эффективную профилактику инфекционных осложнений при разнообразных критических состояниях. Данный метод антимикробной профилактики позволяет повышать выживаемость пациентов, сокращать время их пребывания в стационаре, а также имеет высокую экономическую эффективность [3].

Эффективность СДК во многом зависит от поддержания терапевтических концентраций антибиотиков в просвете кишечника, что требует точного понимания их фармакокинетики при энтеральном введении. Традиционные методы изучения фармакокинетики антимикробных препаратов *in vivo* и *in vitro* обладают рядом ограничений, включая высокую стоимость, сложность контроля динамики концентраций и этические барьеры при использовании животных моделей [4]. В связи с этим разработка динамических проточных систем, имитирующих физиологические условия кишечника, представляет значительный интерес для доклинических исследований [5].

Ввиду развития устойчивости бактерий к антибиотикам, важной задачей современной антибиотикотерапии является разработка новых режимов дозирования, обеспечивающих предотвращение селекции устойчивых мутантов в процессе лечения. Для этих целей возможно проведение исследований антимикробного эффекта в динамических системах, с помощью которых можно моделировать фармакокинетические профили антибактериальных

препаратов *in vitro*. Это открывает возможность для определения минимальных концентраций антибиотиков, предотвращающих селекцию антибиотикорезистентных мутантов (МПК_М) и оптимизации режимов дозирования [6].

Способность антибиотика вызывать гибель чувствительной части популяции, которая является основной мишенью в динамической системе, не всегда отражает его способность воздействовать на резистентные микроорганизмы, образующиеся в результате спонтанных мутаций. Согласно концепции «окна селекции мутантов» (ОСМ) появление антибиотикорезистентных мутантов возможно тогда, когда концентрация антибиотика выше его минимальной подавляющей концентрации (МПК), но ниже МПК_М [7]. Моделируемые в динамической системе концентрации антимикробных препаратов в разные интервалы времени могут находиться как за пределами ОСМ, так и внутри него.

Антибиотикотерапия с использованием комбинаций из двух и более антибиотиков может использоваться как для преодоления экстремальной и полной антибиотикорезистентности за счет синергидного антимикробного эффекта, так и для предотвращения развития мутационной устойчивости в процессе лечения. В ходе многочисленных исследований было показано, что эффект сочетанного использования антибиотиков трудно прогнозируем, что требует определения чувствительности к комбинациям антибиотиков для подбора наиболее эффективных комбинаций [8]. Данные о влиянии различных комбинаций антибиотиков на частоту возникновения мутационной устойчивости немногочисленны и противоречивы. С учетом разнообразия механизмов устойчивости бактерий, требуется проведение фармакокинетического моделирования для определения режимов комбинированной антибиотикотерапии, препятствующих возникновению мутационной устойчивости к антибиотикам у клинически значимых микроорганизмов.

В настоящее время для моделирования фармакокинетики антибиотиков *in vitro* применяются статические и динамические системы, например, модели на основе биореакторов, позволяющие контролировать параметры среды (рН, температура, перфузия), многочашечные системы с непрерывным разбавлением, имитирующие элиминацию препаратов, а также микрофлюидные платформы, обеспечивающие высокую точность дозирования [9, 10].

Большинство существующих систем не адаптированы для моделирования режимов селективной деконтаминации. Кроме того, недостаточно изучена валидация таких моделей в сравнении с расчетными фармакокинетическими профилями.

Цель исследования: разработать и создать динамическую проточную систему, моделирующую режимы энтерального введения антимикробных лекарственных средств.

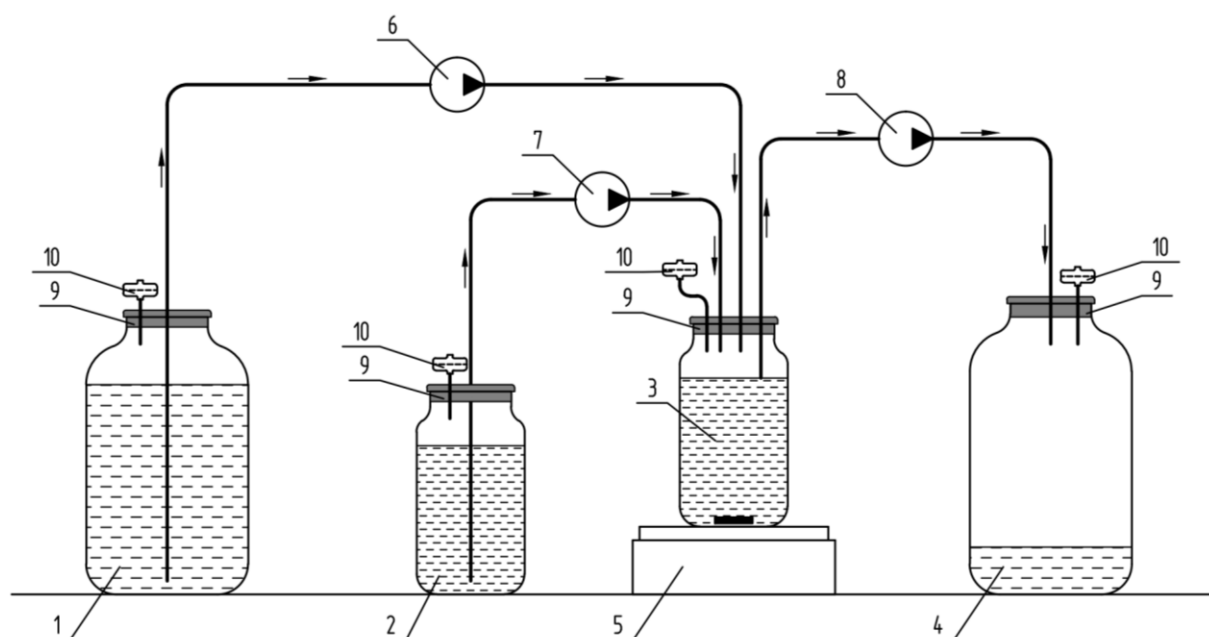
Материалы и методы исследования. Сконструирована однокамерная динамическая проточная система, моделирующая энтеральное поступление антибиотиков в толстый кишечник (рисунок 1). Система представляет собой стеклянные флаконы, закрытые силиконовыми пробками с вмонтированными в них патрубками, и соединенные между собой силиконовыми шлангами.



Рисунок 1. Однокамерная динамическая модель селективной деконтаминации кишечника

1 – флакон с питательной средой для подачи в основную камеру; 2 – основная камера; 3 – раствор антибиотика; 4 – флакон для сброса из основной камеры; 5 – магнитный смеситель; 6, 7, 8 – дистанционно управляемые перистальтические насосы

В составе системы 4 емкости: емкость с питательной средой (бульон Мюллера-Хинтон, триптон-соевый бульон или бульон с сердечно-мозговой вытяжкой), емкость с раствором антибиотика, основная камера, совмещенная с магнитным смесителем, и емкость для удаления жидкости из основной камеры. Ток жидкости между емкостями осуществляется при помощи трех дистанционно управляемых перистальтических насосов, обеспечивающих дозирование антибиотика и его контролируемую элиминацию. Все материалы, из которых собрана система, являются термостойкими и стерилизуются воздушным методом (180 °С – 60 мин). Для компенсации давления газа во флаконах в пробки дополнительно вмонтированы патрубки с закрепленными на них бактериальными фильтрами (бактериальные шприц-насадки с диаметром пор 0,22 мкм). Объем основной камеры составляет 40 мл и лимитируется глубиной погружения отводящего патрубка. Объемы флакона с питательной средой и флакона для сброса из основной камеры составляют 500 мл. Принципиальная схема системы представлена на рисунке 2.



1 – флакон со средой для подачи в основную камеру; 2 – раствор антибиотика; 3 – основная камера; 4 – флакон для сброса из основной камеры; 5 – магнитная мешалка; 6, 7, 8 – дистанционно управляемые перистальтические насосы; 9 – пробка силиконовая; 10 – фильтр бактериальный.

Рисунок 2. Дистанционно управляемая программируемая динамическая проточная система, моделирующая режимы энтерального введения антимикробных лекарственных средств в режиме селективной деконтаминации кишечника (принципиальная схема)

Система собирается и стерилизуется, асептично заполняется питательной средой и стерильным раствором антибиотиков. В основную камеру дозированно вносится необходимое количество суспензии тестируемой культуры микроорганизма. Шланги подключаются к перистальтическим насосам. Смонтированная заполненная система устанавливается в камеру термостата и на всем протяжении кинетического эксперимента инкубируется при 35 °С. Перистальтические насосы и магнитный смеситель запускаются и отключаются через WiFi-контроллеры, управляемые дистанционно через мобильное приложение.

Моделирование энтерального поступления колестиметата натрия для однокамерной динамической проточной системы. Выполнено моделирование энтерального введения колестиметата натрия, представляющего собой нерезорбируемый из кишечника пептидный антибиотик. Объем кишечника принимали равным 2000 мл, разовая доза антибиотика по 2 млн МЕ (66 мг), введение антибиотика каждые 8 ч в течение 5 суток. В динамической проточной модели (объем основной камеры 40 мл, масштаб 1 : 50) это соответствовало введению 40 000 МЕ (1,32 мг) каждые 8 часов. Для элиминации антибиотика выполнялась перфузия питательной среды в основной камере с кратностью замещения 5 % (2 мл) в час.

Определение концентраций антибиотика, создаваемой в динамической проточной системе. В качестве модельного антибиотика выбран рифампицин. Методика его количественного определения в растворах – спектрометрия по удельному показателю поглощения. Использовали фармацевтическую субстанцию рифампицина (Rifampicin, Art. No. 4163.3, Carl Roth, Германия). Стоковый раствор рифампицина с концентрацией 100 мг/мл готовили в метаноле, в качестве разбавителя использовали стерильную дистиллированную воду.

Спектры поглощения раствора рифампицина (2 мг/л) оценивали на микропланшетном ридере Infinite M200 (TECAN, Австрия) в диапазоне 300–1000 нм. Данные регистрировали при помощи программы Magellan 6.6 (TECAN). Для определения концентрации рифампицина в растворе подготовлены контрольные образцы в диапазоне концентраций 0–1,25 мг/л, по которым была построена калибровочная кривая.

Для исследования стабильности оптических характеристик раствор рифампицина с концентрацией 2 мг/л хранили при комнатной температуре и ежедневно на протяжении 3 дней определяли концентрацию антибиотика спектрофотометрическим методом.

Результаты и их обсуждение. *Результаты моделирования энтерального поступления колистиметата натрия для однокамерной динамической проточной системы.*

Расчетные моделируемые концентрации колистиметата натрия (энтеральное поступление 66 мг антибиотика каждые 8 часов в течение 5 суток) представлены на рисунке 3. Объем кишечника приняли равным 2000 мл, кратность замещения объема составляла 5 % в час.



Рисунок 3. Моделируемые расчетные концентрации колистиметата натрия в динамической проточной системе

Концентрации антибиотика, создаваемые в динамической проточной системе в различные временные промежутки.

Спектр поглощения рифампицина характеризовался двумя полосами поглощения с максимумами при длинах волн 329 нм и 470 нм (рисунок 4). Исследование стабильности оптических характеристик раствора рифампицина (2 мг/л) показало, что в течение трех суток интенсивность поглощения при 470 нм сохранялась стабильной, что свидетельствует об устойчивости рифампицина в водном растворе.

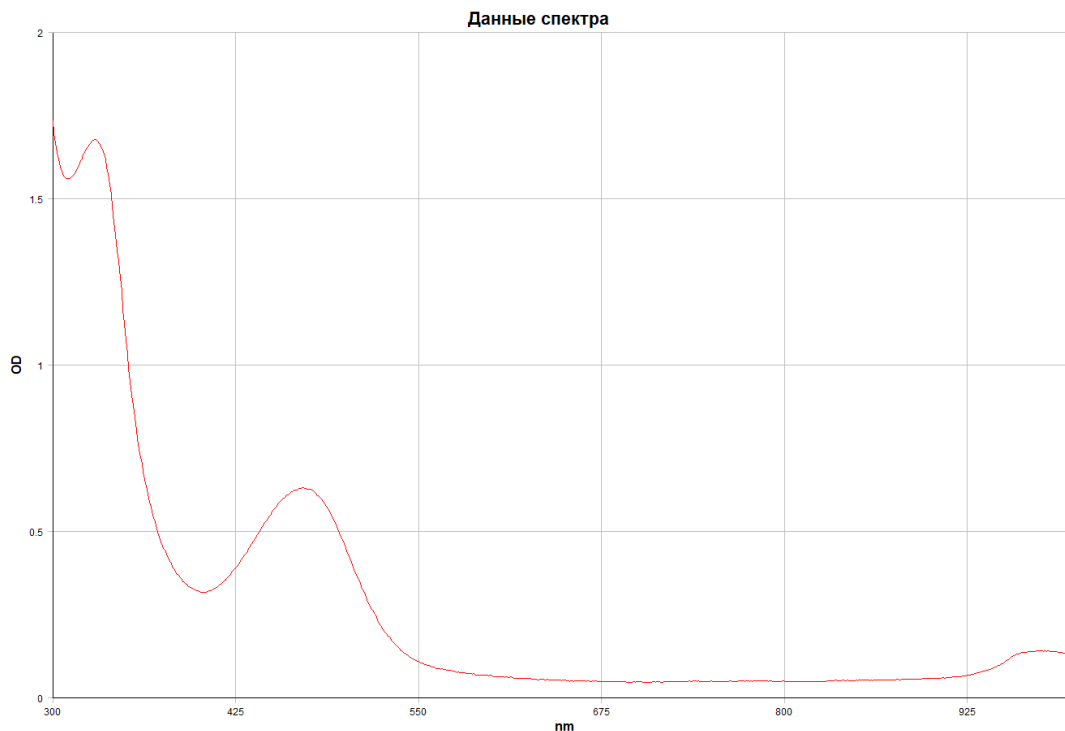


Рисунок 4. Спектр поглощения водного раствора рифампицина

Для определения концентрации рифампицина в растворе подготовлены контрольные образцы и построена калибровочная кривая. С использованием разработанной динамической проточной системы выполнено моделирование энтерального введения рифампицина. Проведена калибровка и настройка динамической проточной системы. Объем кишечника принимали равным 1800 мл, разовая доза антибиотика по 200 мг, введение антибиотика каждые 8 ч в течение 56 ч. Для элиминации антибиотика выполнялась перфузия питательной среды в основной камере с кратностью замещения 5 % (2 мл) в час. Ежечасно в каждом цикле замещения объема отбирался отводящийся из основной камеры раствор. Всего получено 56 образцов (контрольных точек). Для каждого из них с использованием микропланшетного ридера Infinite M200 проведено определение OD₄₇₀ и рассчитана концентрация рифампицина.

Фактические концентрации рифампицина, создаваемые в динамической проточной системе, были определены фотоколориметрическим методом. При сопоставлении расчетных моделируемых концентраций рифампицина и его концентраций, фактически создаваемых динамической проточной системой, получены совпадающие кинетические профили (рисунок 5).

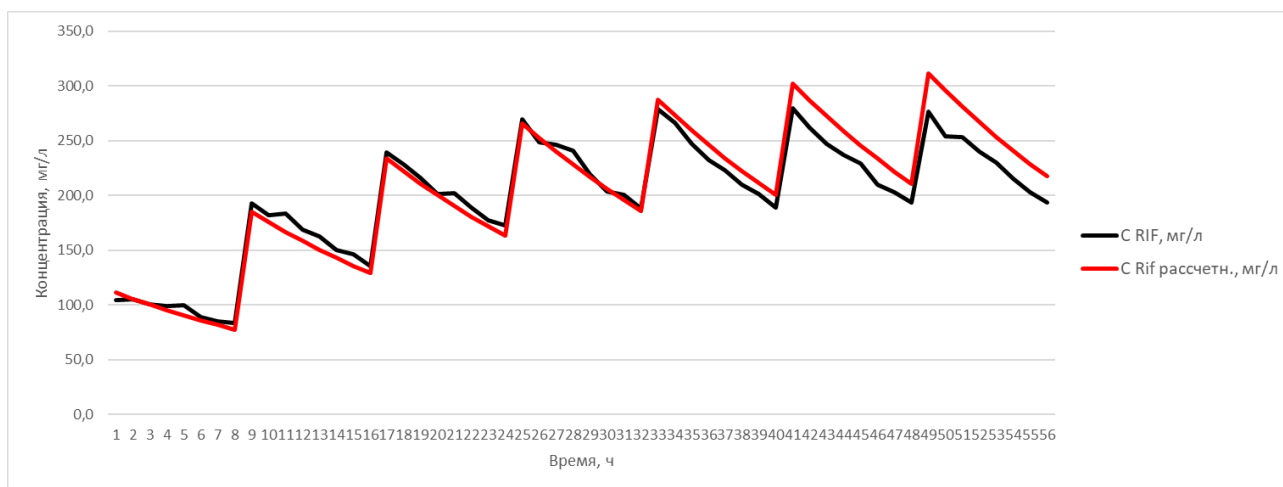


Рисунок 5. Расчетные и фактические концентрации рифампицина в динамической проточной системе

Таким образом, сконструирована и собрана динамическая проточная система, способная в режиме реального времени моделировать пероральное поступление антибиотиков в кишечник и их постепенную элиминацию. С помощью спектрофотоколориметрического метода определены концентрации рифампицина, создаваемые в динамической проточной системе в различные временные промежутки. Показано, что создаваемые в динамической проточной системе кинетические профили антибиотика совпадают с расчетными значениями.

Заключение. Сконструирована, собрана и откалибрована динамическая проточная система, способная в режиме реального времени моделировать пероральное поступление антибиотиков в кишечник и их постепенную элиминацию, а также выполнять культивирование исследуемых микроорганизмов в присутствии динамически изменяющихся концентраций антибиотиков. Проведено моделирование энтерального введения колистиметата натрия. Определены спектры поглощения водного раствора рифампицина, определены максимумы поглощения при длинах волн 329 нм и 470 нм. Выполнено моделирование энтерального введения антибиотика. При сопоставлении расчетных моделируемых концентраций рифампицина и его концентраций, фактически создаваемых динамической проточной системой, получены совпадающие кинетические профили. Проведенная спектрофотометрическая валидация кинетики рифампицина подтверждает точность модели.

Разработанная модель позволит оптимизировать режимы дозирования антибиотиков для селективной деконтаминации кишечника, снизить затраты на доклинические исследования и минимизировать использование животных в фармакокинетических экспериментах.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант М24У-002).

Литература:

- [1]. Lemiech-Mirowska E., Kiersnowska Z., Michalkiewicz M. et al. Nosocomial infections as one of the most important problems of healthcare system // *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 2021. Vol. 28, No. 3. P. 361366.
- [2]. Барсук А. Л., Некаева Е. С., Ловцова Л. В., Ураков А. Л. Селективная деконтаминация кишечника как метод профилактики инфекционных осложнений у пациентов с термической травмой (обзор) // *Современные технологии в медицине*. 2020. Т. 12, № 6. С. 86–97.
- [3]. Rommes H., Taylor N., Petros A. et al. Selective decontamination of the digestive tract is a four-component strategy // *Intensive Care Medicine*. 2020. Vol. 46, No. 9. P. 1796–1797.
- [4]. Plantinga N. L., Bonten M. Selective decontamination and antibiotic resistance in ICUs // *Critical Care*. 2015. Vol. 19, No. 1. P. 1–7.
- [5]. Wittekamp B. H., Oostdijk E. A., De Smet A. M. G., Bonten M. Jm. Colistin and tobramycin resistance during long-term use of selective decontamination strategies in the intensive care unit: a post hoc analysis // *Critical Care*. 2015. Vol. 19, No. 1. P. 1–6.
- [6]. Голикова М. В., Струкова Е. Н., Алиева К. Н. и др. Антимутантная эффективность комбинированной терапии дорипенемом и левофлоксацином: исследования в динамических системах in vitro с *Pseudomonas aeruginosa* // *Антибиотики и химиотерапия*. 2021. Т. 66, № 3–4. С. 12–17.
- [7]. Струкова Е. Н., Смирнова М. В., Востров С. Н. и др. Прогнозирование развития антибиотикоустойчивости при моделировании клинических режимов дозирования в динамической системе in vitro // *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2009. Т. 11, № 2. С. 152–160.
- [8]. Тапальский Д. В. Чувствительность к комбинациям антибиотиков продуцирующих карбапенемазы нозокомиальных штаммов грамотрицательных бактерий, выделенных в Беларуси // *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2018. Т. 20, № 3. С. 182–191.
- [9]. Nielsen E. I., Cars O., Friberg L. E. Pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) indices of antibiotics predicted by a semimechanistic PKPD model: a step toward model-based dose optimization // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2011. Vol. 55, No. 10. P. 4619–4630.
- [10]. Abbott I. J., Roberts J. A., Meletiadi J., Peleg A. Y. Antimicrobial pharmacokinetics and preclinical in vitro models to support optimized treatment approaches for uncomplicated lower urinary tract infections // *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. 2021. Vol. 19, No. 3. P. 271–295.

D. V. TAPALSKI, M. V. SIMONCHIK, E. V. KARPOVA

PHARMACOKINETIC MODELING OF SELECTIVE DIGESTIVE DECONTAMINATION USING A SINGLE-CHAMBER DYNAMIC FLOW SYSTEM

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

Summary

A dynamic flow system was designed, assembled, and calibrated to simulate real-time oral antibiotic delivery into the intestine and their gradual elimination. Enteral administration of colistin and rifampicin was modeled. Comparison of simulated pharmacokinetic concentrations of rifampicin with actual concentrations generated by the dynamic flow system revealed matching kinetic profiles.

Keywords: pharmacokinetics, antibiotics, modeling, digestive decontamination.

В. Г. БОГДАН¹, Е. В. ФЁДОРОВА², Т. А. ФИЛИПОВИЧ²,
И. П. ЖАВОРОНОК², А. С. ДОРОНЬКИНА², С. Г. ЛЕПЕШКО², С. В. МАНЬКОВСКАЯ²

АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ КЛЕТОЧНОГО ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА ПРИ ЛОКАЛЬНОМ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПЛАЗМИДНОЙ КОНСТРУКЦИИ VEGF165 / ANG-1 В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ

¹Отделение медицинских наук Национальной академии наук Беларуси,
г. Минск, Республика Беларусь

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

Применение генно-инженерной плазмидной конструкции pcDNA_VEGF165/Ang-1 в дозе 100 мкг/жив в модели хронической ишемии нижних конечностей у крыс приводит к выраженной активизации ферментов энергетического обмена, статистически значимому повышению активности сукцинат- и лактатдегидрогеназы в клетках ишемизированной мышечной ткани лабораторных животных на 14-е сутки после терапии с последующей активацией процессов в цикле Кребса и гликолитическом пути к 42-ым суткам наблюдений. Таким образом, разработанная генно-инженерная плазмидная конструкция pcDNA_VEGF165/Ang-1 оказывает выраженное и пролонгированное цитопротективное действие.

Ключевые слова: хроническая ишемия нижних конечностей, генная терапия, фактор роста эндотелия сосудов, ангиопоэтин-1, эксперимент, крысы, гистохимический анализ.

Введение. Хроническая ишемия нижних конечностей (ХИНК) является распространенным патологическим состоянием с нарушением кровоснабжения в артериях нижних конечностей, которое снижает функциональную способность и качество жизни пациентов. Несмотря на относительно эффективные и доступные методы лечения хроническая недостаточность артериального кровоснабжения остается серьезной проблемой здравоохранения, связанной со значительной заболеваемостью и смертностью [1].

В настоящее время терапевтический ангиогенез является одной из стратегий в лечении ишемических заболеваний и направлен на стимуляцию роста и ремоделирование кровеносных сосудов. В современных условиях формирование новых функциональных сосудов достигается с помощью введения рекомбинантных ангиогенных факторов, их генов или прогениторных клеток, способных продуцировать ангиогенные факторы и факторы роста или дифференцироваться в клетки сосудов [2, 3]. Для терапевтического ангиогенеза применяются такие факторы роста как VEGF, bFGF, HGF, PDGF, ANG-1 и IGF-1 [2]. Сосудисто-эндотелиальный фактор роста (VEGF) является ключевым регулятором в физиологическом и патологическом ангиогенезе, стимулирующим образование и рост сосудов из ранее существовавших дифференцированных эндотелиальных клеток сосудистой сети [4]. Формирование новых функциональных кровеносных сосудов начинается путем миграции и пролиферации эндотелиальных клеток или их предшественников. В развитии эндотелиальных клеток важную роль играет и экспрессируемый муральными клетками ангиопоэтин-1 (Ang-1), который регулирует созревание и стабильность сосудов, связываясь с тирозинкиназными рецепторами на их поверхности. [5, 6].

При хронической недостаточности артериального кровоснабжения происходит ослабление кровотока, ухудшение кровообращения в сосудах микроциркуляторного русла, снижение доставки кислорода тканям, что вызывает тканевую гипоксию и нарушение тканевого обмена. В условиях возникшей гипоксии происходит переключение с аэробного на анаэробный путь синтеза АТФ, который является основным источником энергии в организме человека. [7]. Помимо дефицита кислорода и/или субстратов метаболизма синтез АТФ может быть нарушен и в результате снижения активности ферментов тканевого дыхания и гликолиза, повреждения и разрушения митохондрий, в которых осуществляются реакции цикла Кребса и перенос электронов к молекулярному кислороду, сопряженному с фосфорилированием АДФ. Нарушение процесса активации клеточных ферментов вызывает существенное изменение интенсивности метаболических реакций и, как следствие, приводит к нарушению жизнедеятельности клетки [8].

Критическое снижение напряжения кислорода в цитоплазме клеток при глубокой ишемии приводит к остановке транспорта электронов по дыхательной цепи митохондрий и прекращению образования АТФ путем окислительного фосфорилирования. Практически одновременно происходит активация фосфофруктокиназы – ключевого фермента анаэробного пути расщепления глюкозы (гликолиза). Активация гликолитического пути сопровождается повышением внутриклеточной, а затем и внеклеточной концентрации лактата с наступлением ацидоза. В норме лактатдегидрогеназа (ЛДГ) катализирует переход лактата в пируват, который находится на стыке аэробного и анаэробного метаболизма, и в дальнейшем вступает в цикл Кребса. Рост активности ЛДГ указывает на активацию анаэробного гликолиза [9].

Сукцинатдегидрогеназа (СДГ) является одним из важнейших ферментов цикла Кребса, локализуется на внутренней мембране митохондрий и катализирует обратимое окисление янтарной кислоты (сукцината) до фумаровой. СДГ – единственный фермент цикла Кребса, одновременно являющийся комплексом электрон-транспортной цепи [10]. Оценка изменения активности ферментов, катализирующих окислительно-восстановительные реакции в мышцах, позволяет судить об интенсивности процессов, происходящих в самой клетке, и разрабатывать эффективные способы влияния на эти процессы [11].

В Институте биоорганической химии НАН Беларуси разработана отечественная генотерапевтическая конструкция на основе кольцевой ДНК, содержащая участки генов VEGF и Ang (pcDNA_VEGF165/Ang-1). В проведенных ранее исследованиях установлена положительная динамика регресса симптомов хронической ишемии с восстановлением функционального состояния оперированной конечности к 28-м суткам после использования генно-инженерной векторной конструкции VEGF165/Ang-1 в эксперименте, которая сопровождается выраженным антиноцицептивным эффектом, что указывает на высокий потенциал разработки в качестве прототипа первого отечественного комбинированного генотерапевтического средства [12].

Цель данной работы заключалась в проведении анализа динамики изменения активности ферментов клеточного энергетического обмена при локальном использовании плазмидной конструкции pcDNA_VEGF165/Ang-1 в модельном эксперименте *in vivo*

Материалы и методы. Эксперименты проведены на 46 половозрелых крысах Wistar возрастом 8 месяцев, содержащихся в условиях вивария Института физиологии НАН Беларуси при температуре $22,0 \pm 1,0$ °C и 12/12 ч цикле ночь/день со свободным доступом к воде и пище. Протокол исследования одобрен Комитетом по биоэтике Института физиологии НАН Беларуси (протокол № 1 от 24.01.2024).

Плазмида, экспрессирующая гибридный белок VEGF165-Ang-1, разработана в Институте биоорганической химии НАН Беларуси и передана в Институт физиологии в виде стерильного раствора для инъекций. Введение исследуемой субстанции осуществляли однократно внутримышечно в правую заднюю лапу животного.

Экспериментальную модель хронической недостаточности артериального кровоснабжения (ишемии) задней конечности у крыс создавали по разработанному способу [13]. На 28-е сутки после моделирования патологии животных методом рандомизации распределили на четыре группы: интактная (3 самца и 3 самки), «ХИНК» (без лечения; 4 самца и 4 самки), «ХИНК + АФР» (ведение физиологического апиогенного раствора, 200 мкл; 4 самца и 4 самки), экспериментальная «ХИНК + VEGF165/Ang-1» (введение pcDNA_VEGF165/Ang-1 ng-1 в дозе 100 мкг/жив; 12 самцов и 12 самок).

Образцами для исследования послужили фрагменты тканей скелетных мышц бедра и голени экспериментальных животных на 7, 14, 28 и 42 сутки после лечения. Срезы образцов толщиной 14 мкм изготавливали с помощью микротом-криостата Microm HM 525 (Германия) и обрабатывали общепринятыми гистохимическими методами на выявление активности ферментов энергетического обмена: СДГ и ЛДГ. Активность ферментов оценивали на основании определения оптической плотности конечного продукта реакции в цитоплазме клеток с помощью компьютерной программы обработки данных Image J (1.49k, США), выражая результаты в условных единицах (у.е.) оптической плотности.

Анализ данных выполняли с помощью программы Statistica 10.0. Проверку гипотезы о нормальном распределении количественных показателей осуществляли по критерию Колмогорова-Смирнова ($p \leq 0,05$). Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартного отклонения ($M \pm Sd$). Анализ статистической значимости количественных признаков определяли с помощью t-критерия Стьюдента и уровнем значимости $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение. На 7-е сутки у самок и самцов крыс в миоцитах мышц бедра выявлена незначительная активизация аэробных процессов: активность СДГ значимо повышалась у самок на 3,4 %, 4,4 %, 4,3 %, у самцов – на 3,7 %, 3,5 %, 4,8 % (группы «ХИНК», «ХИНК + АФР», «ХИНК + VEGF165/Ang-1», $p = 0,001$ для всех групп) относительно интактной группы животных. В мышечных клетках голени крыс обоих полов отмечали аналогичные изменения: статистически значимые повышения СДГ относительно значений до операции зафиксированы в группах «ХИНК» – на 7,1 %, «ХИНК + АФР» – на 7,9 %, «ХИНК + VEGF165/Ang-1» – на 8,1 % ($p = 0,001$ для всех групп) у самок и в группах «ХИНК» – на 3,8 %, «ХИНК + АФР» – на 3,7 %, «ХИНК + VEGF165/Ang-1» – на 7,6 % ($p = 0,001$ для всех групп) у самцов (рисунок 1 А, Б).

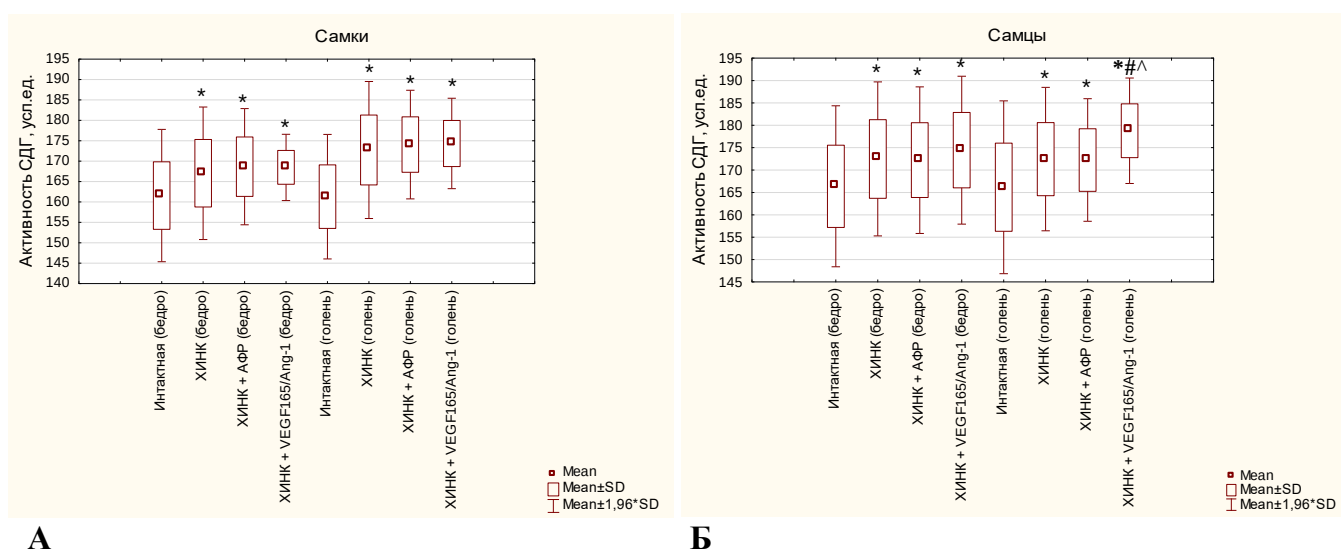


Рисунок 1. Активность сукцинатдегидрогеназы в миоцитах скелетных мышцах нижней

конечности крыс экспериментальных групп на 7-е сутки наблюдения. А – самки, Б – самцы. * – $p < 0,001$ по отношению к показателям интактной группы, # – $p < 0,001$ по отношению к показателям группы «ХИНК», ^ – $p < 0,001$ по отношению к показателям группы «ХИНК + АФР»

Введение раствора pcDNA_VEGF165/Ang-1 самцам с ишемией сопровождалось достоверным повышением в мышцах голени СДГ на 3,7 % ($p = 0,001$) и на 3,8 % ($p = 0,001$) – по сравнению с группами «ХИНК» и «ХИНК + АФР» соответственно (рисунок 1 Б).

Активность ЛДГ, показателя гликолиза, на 7-е сутки наблюдения значимо повышалась как в бедре, так и в голени самок лабораторных животных. Так, в миоцитах мышц бедра регистрировали достоверное увеличение ЛДГ на 14,5 % в группе «ХИНК», на 13,4 % в группе «ХИНК + АФР» и на 14,2 % в группе «ХИНК + VEGF165/Ang-1» в сравнении с показателями интактной группы крыс ($p = 0,001$ для всех групп). В голени самок отмечено возрастание ЛДГ на 14,9 %, 13,4 %, 14,8 % (группы «ХИНК», «ХИНК + АФР», «ХИНК + VEGF165/Ang-1», $p = 0,001$ для всех групп) относительно значений, характерных для здоровой конечности животного (рисунок 2 А). У самцов наблюдалась активизация гликолитических процессов в ишемизированных мышцах во всех опытных группах относительно здоровой конечности на 7-е сутки мониторинга, что выражалось в повышении активности ЛДГ в бедре на 11,0 %, 12,0 %, 11,0 % (группы «ХИНК», «ХИНК + АФР», «ХИНК + VEGF165/Ang-1», $p = 0,001$ для всех групп) и голени на 6,1 %, 5,2 %, 11,9 % ($p = 0,001$ для всех групп) соответственно аналогичным группам сравнения. Применение генно-инженерной плазмидной конструкции, приводило к статистически значимому повышению активности ЛДГ в мышцах голени относительно групп «ХИНК» на 5,5 % и «ХИНК + АФР» на 6,4 % ($p = 0,001$ для обеих групп) (рисунок 2 Б).

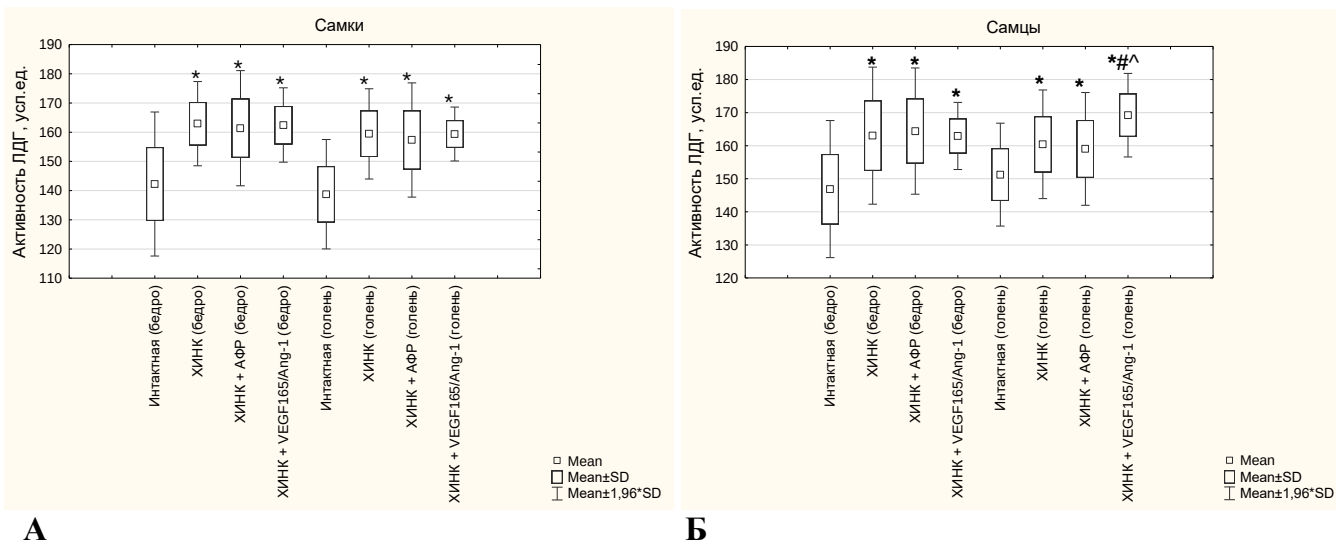


Рисунок 2. Активность лактатдегидрогеназы в миоцитах скелетных мышц нижней

конечности крыс экспериментальных групп на 7-е сутки наблюдения. А – самки, Б – самцы. * – $p < 0,001$ по отношению к показателям интактной группы, # – $p < 0,001$ по отношению к показателям группы «ХИНК», ^ – $p < 0,001$ по отношению к показателям группы «ХИНК + АФР»

На 14-е сутки наблюдения статистически значимых различий активности СДГ в клетках мышечной ткани бедра самок крыс между группами животных не обнаружено ($p > 0,05$ для всех групп). У самцов в ишемизированных мышцах бедра отмечали повышение активности аэробного окисления глюкозы в группах «ХИНК» – на 4,2 %, «ХИНК + АФР» – на 4,3 %, «ХИНК + VEGF165/Ang-1» – на 6,8 % ($p = 0,001$ для всех групп) по сравнению со значениями для здоровой конечности. В голени грызунов обоего пола также выявлены статистически значимые повышения СДГ относительно интактных значений в группах «ХИНК» – на 4,9 %, «ХИНК + АФР» – на 5,4 %, «ХИНК + VEGF165/Ang-1» – на 8,9 % ($p = 0,001$ для всех групп) у самок и в группах «ХИНК» – на 6,5 %, «ХИНК + АФР» – на 6,8 %, «ХИНК + VEGF165/Ang-1» – на 9,3 % ($p = 0,001$ для всех групп) у самцов. Введение раствора pcDNA_VEGF165/Ang-1 животным с ХИНК сопровождалось повышением СДГ в мышечной ткани голени самок на 3,8 % и 3,3 % ($p = 0,001$ для обеих групп), в голени на 2,6 %

($p = 0,007$) и 2,3 % ($p = 0,001$) и бедре на 2,5 % и 2,4 % ($p = 0,001$ для обеих групп) самцов относительно групп «ХИНК» и «ХИНК + АФР» (рисунок 3 А, Б).

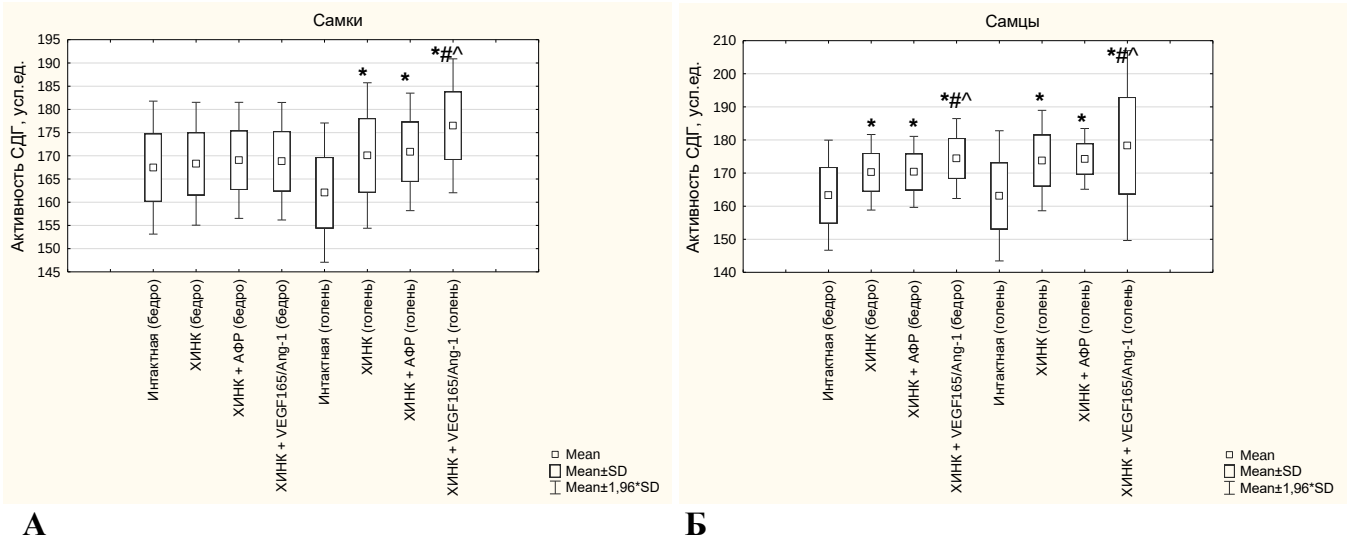


Рисунок 3. Активность сукцинатдегидрогеназы в миоцитах скелетных мышц нижней конечности крыс экспериментальных групп на 14-е сутки наблюдения. А – самки, Б – самцы. * – $p < 0,001$ по отношению к показателям интактной группы, # – $p < 0,001$ по отношению к показателям группы «ХИНК», ^ – $p < 0,001$ по отношению к показателям группы «ХИНК + АФР»

К 14-м суткам мониторинга статистически значимых различий активности ЛДГ в клетках мышечной ткани бедра самцов крыс между группами животных (кроме группы «ХИНК + VEGF165/Ang-1») не обнаружено ($p > 0,05$ для всех групп). При этом в голени самцов и в бедре и голени самок отмечено снижение гликолитических процессов в ишемизированных мышцах во всех опытных группах относительно здоровой конечности. Так, активность ЛДГ значительно снижалась в бедре самок на 5,0 %, 4,1 % ($p = 0,001$ для всех групп), 2,9 % ($p = 0,002$) (группы «ХИНК», «ХИНК + АФР», «ХИНК + VEGF165/Ang-1»); в голени самок на 6,8 %, 6,7 % ($p = 0,001$ для всех групп) и голени самцов на 2,9 %, 3,3 % ($p = 0,001$ для всех групп) соответственно группам «ХИНК», «ХИНК + АФР» (рисунок 4 А, Б).

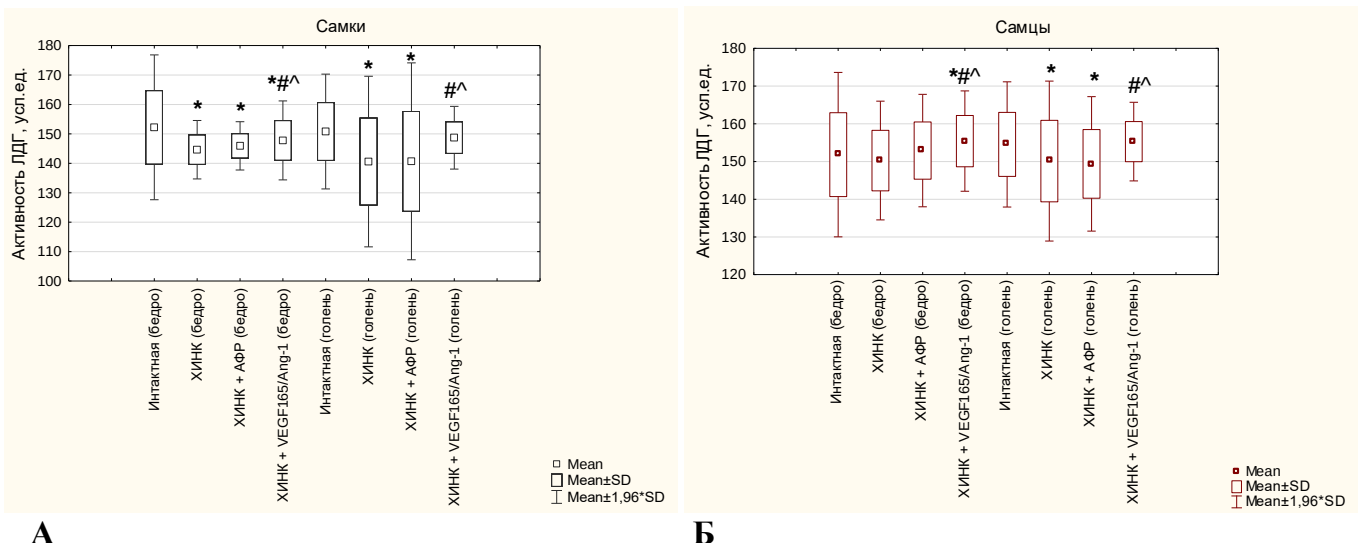


Рисунок 4. Активность лактатдегидрогеназы в миоцитах скелетных мышц нижней конечности крыс экспериментальных групп на 14-е сутки наблюдения. А – самки, Б – самцы. * – $p < 0,05$ по отношению к показателям интактной группы, # – $p < 0,05$ по отношению к показателям группы «ХИНК», ^ – $p < 0,05$ по отношению к показателям группы «ХИНК + АФР»

Введение раствора pcDNA_VEGF165/Ang-1 приводило к возрастанию активности ЛДГ как в голени, так и в бедре грызунов обоего пола: на 2,2 % ($p = 0,001$) и на 1,3 % ($p = 0,022$) – в бедре самок, на 3,4 % ($p = 0,001$) и на 1,6 % ($p = 0,015$) – в бедре самцов, на 5,7 % ($p = 0,001$) и на 5,7 % ($p = 0,002$) – в голени самок, на 4,0 % ($p = 0,042$) и на 4,0 % ($p = 0,001$) – в голени самцов относительно групп «ХИНК» и «ХИНК + АФР» (См. рисунок 4 А, Б).

К 28-м суткам у крыс обоих полов выявлено угнетение окисления глюкозы в цикле Кребса: статистически значимое снижение активности СДГ относительно интактных значений зарегистрировано у самок в группе «ХИНК» в бедре на 10,4 %, в голени – на 7,3 %, в группе «ХИНК + АФР» в бедре на 11,0 %, в голени – на 7,1 %; у самцов в группе «ХИНК» в бедре на 10,7 %, в голени – на 14,1 %, в группе «ХИНК + АФР» в бедре на 11,6 %, в голени – на 13,6 % ($p = 0,001$ для всех групп). Выраженную активизацию аэробных процессов в ишемизированных мышцах вызывало применение раствора pcDNA_VEGF165/Ang-1. Относительно показателей здоровой конечности в группе «ХИНК + VEGF165/Ang-1» установлено повышение СДГ в бедре (на 5,6 % и 6,8 %, $p = 0,001$) и голени (на 6,1 % и 10,4 %, $p = 0,001$) самок и самцов, соответственно. По отношению к группам «ХИНК» и «ХИНК + АФР» после введения раствора pcDNA_VEGF165/Ang-1 зафиксировано увеличение активности СДГ у самок (в бедре на 17,2 % и 18,0 %, в голени на 14,5 % и 14,3 %, $p = 0,001$ для всех групп) и у самцов (в бедре на 19,7 % и 20,9 %, в голени на 28,5 % и 27,8 %, $p = 0,001$ для всех групп) (рисунок 5 А, Б).

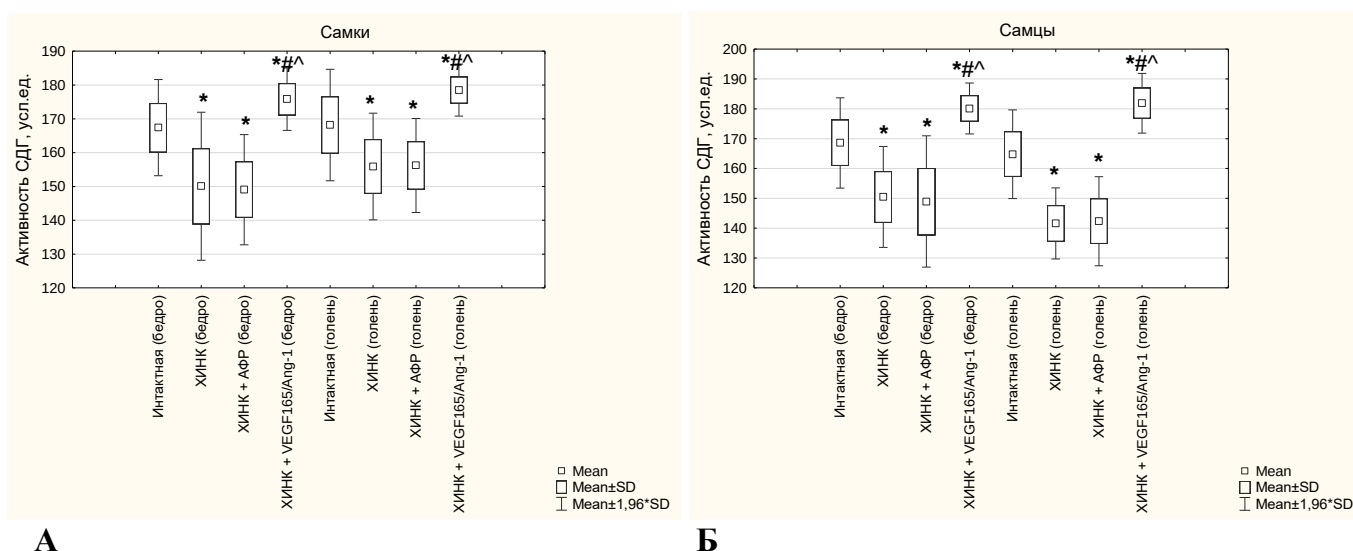


Рисунок 5. Активность сукцинатдегидрогеназы в скелетных мышцах нижней конечности крыс экспериментальных групп на 28-е сутки наблюдения. А – самки, Б – самцы. * – $p < 0,001$ по отношению к показателям интактной группы, # – $p < 0,001$ по отношению к показателям группы «ХИНК», ^ – $p < 0,001$ по отношению к показателям группы «ХИНК + АФР»

Активность ЛДГ в миоцитах скелетных мышц оперированной конечности животных обоих полов на 28-е сутки наблюдений значимо снижалась: в группе с ишемией в бедре самок и самцов соответственно на 9,5 % и 10,5 %, в голени самок и самцов – на 12,8 % и 11,1 %; в группе «ХИНК + АФР» в бедре самок и самцов соответственно на 8,7 % и 10,2 %, в голени самок и самцов – на 12,8 % и 11,2 % ($p = 0,001$ для всех групп) относительно интактной группы крыс. Применение плазмидной конструкции, содержащей VEGF165 и Ang-1, сопровождалось значимой активизацией анаэробных процессов в ишемизированных мышцах лабораторных животных. Так, у самок выявлено повышение активности ЛДГ в бедре на 11,3 % и 10,3 %, в голени на 14,9 % и 14,8 % относительно значений, зафиксированных в группах «ХИНК» и «ХИНК + АФР» ($p = 0,001$ для всех групп). У самцов наблюдали значимое увеличение ЛДГ в мышцах оперированной конечности относительно

всех групп сравнения: на 1,1 % (бедро, $p = 0,009$) и 8,1 % (голень, $p = 0,001$) относительно интактной группы, на 12,9 % (бедро, $p = 0,001$) и 21,6 % (голень, $p = 0,001$) – группы «ХИНК» и на 12,5 % (бедро, $p = 0,001$) и 21,7 % (голень, $p = 0,001$) – группы «ХИНК + АФР» (рисунок 6 А, Б).

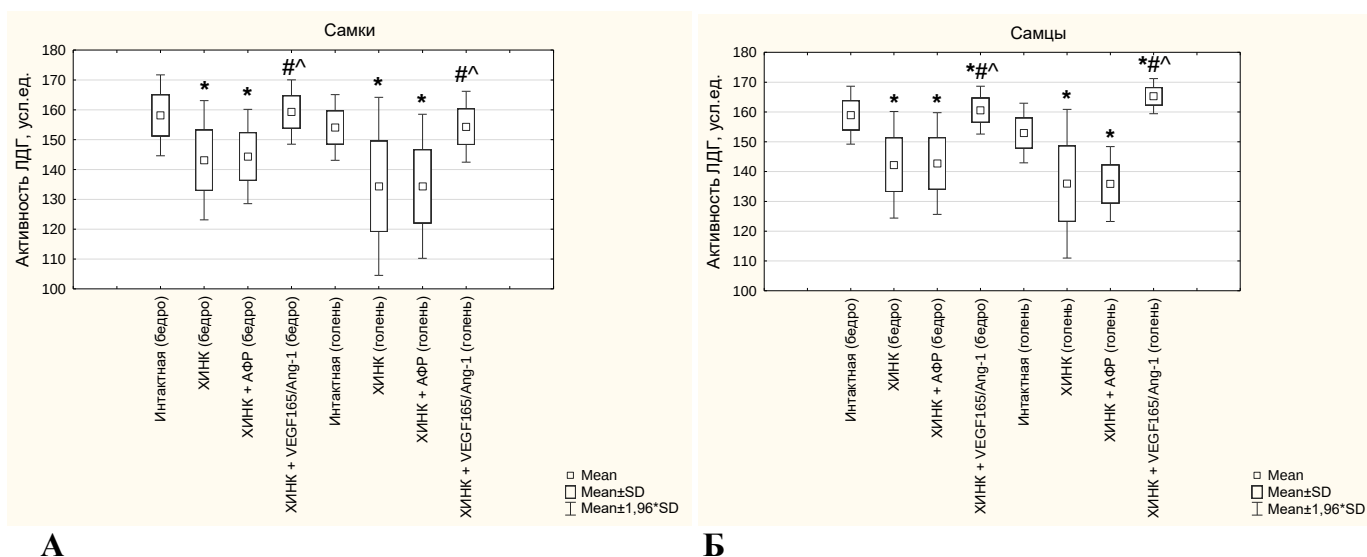


Рисунок 6. Активность лактатдегидрогеназы в скелетных мышцах нижней конечности крыс экспериментальных групп на 28-е сутки наблюдения. А – самки, Б – самцы. * – $p < 0,05$ по отношению к показателям интактной группы, # – $p < 0,05$ по отношению к показателям группы «ХИНК», ^ – $p < 0,05$ по отношению к показателям группы «ХИНК + АФР»

К 42-м суткам мониторинга выявлено увеличение активности СДГ в ишемизированных мышцах бедра и голени самок крыс, превышающее показатели интактной группы (в группах «ХИНК» – в бедре на 3,9 %, в голени – на 5,5 %, «ХИНК + АФР» – в бедре на 4,5 %, в голени – на 5,0 %, «ХИНК + VEGF165/Ang-1» – в бедре на 8,4 %, в голени – на 9,8 % ($p = 0,001$ для всех групп; рисунок 7 А).

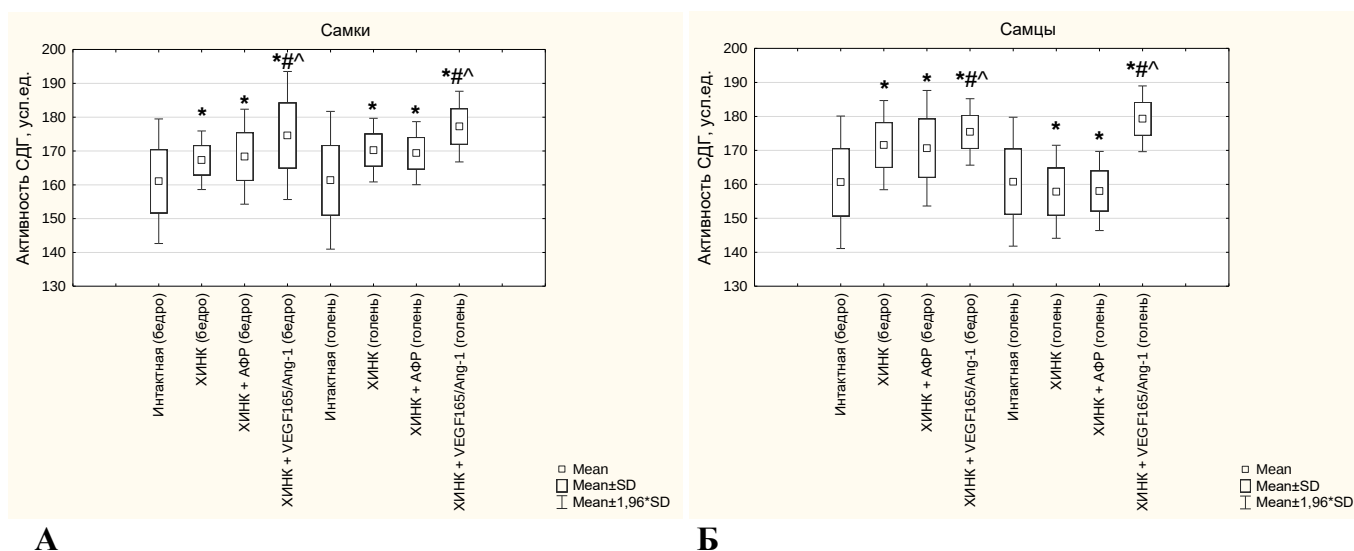


Рисунок 7. Активность сукцинатдегидрогеназы в миоцитах скелетных мышц нижней конечности крыс экспериментальных групп на 42-е сутки наблюдения. А – самки, Б – самцы. * – $p < 0,05$ по отношению к показателям интактной группы, # – $p < 0,05$ по отношению к показателям группы «ХИНК», ^ – $p < 0,05$ по отношению к показателям группы «ХИНК + АФР»

Введение исследуемой субстанции pcDNA_VEGF165/Ang-1 самкам с ХИНК приводило к возрастанию активности СДГ относительно групп с ишемией: в бедре на 4,4 % и 3,7 %, в голени на 4,6 % и 4,6 % ($p = 0,001$ для всех групп) относительно групп «ХИНК» и «ХИНК + АФР» (рисунок 7 А).

В ишемизированных мышцах бедра самцов по сравнению со здоровой конечностью фиксировали статистически значимое увеличение активности СДГ в группах «ХИНК» – на 6,8 %, «ХИНК + АФР» – на 6,2 %, «ХИНК + VEGF165/Ang-1» на 9,2 %, ($p = 0,001$ для всех групп). По сравнению с группами «ХИНК» и «ХИНК + АФР» повышение активности СДГ на 2,3 % и 2,8 % ($p = 0,001$ для обеих групп) в бедре самцов наблюдалось и после введения субстанции pcDNA_VEGF165/Ang-1. В голени самцов отмечали незначительное снижение СДГ на 1,8 % ($p = 0,014$) в группе «ХИНК», на 1,7 % ($p = 0,017$) в группе «ХИНК + АФР» относительно интактной группы животных. Введение исследуемой субстанции pcDNA_VEGF165/Ang-1 самцам с ХИНК приводило к значимому увеличению СДГ в мышцах голени относительно всех групп сравнения: на 11,5 % относительно интактной группы, на 13,6 % – группы «ХИНК» и на 13,4 % ($p = 0,001$ для всех групп) – группы «ХИНК + АФР» (рисунок 7 Б).

На **42-е сутки** наблюдения у самок крыс в клетках мышечной ткани оперированной конечности показатели активности ЛДГ в группах «ХИНК» и «ХИНК + АФР» достигали интактных значений и были статистически не значимы во всех группах сравнения ($p > 0,05$ для всех групп). Введение плазмидной конструкции приводило к статистически значимому повышению активности ЛДГ в мышцах бедра на 5,5 % относительно интактной группы, на 5,9 % – группы «ХИНК» и на 5,8 % ($p = 0,001$ для всех групп) – группы «ХИНК + АФР»; голени – на 9,8 % относительно интактной группы, на 7,8 % – «ХИНК» и на 8,5 % – «ХИНК + АФР» ($p = 0,001$ для всех групп) (рисунок 8 А).

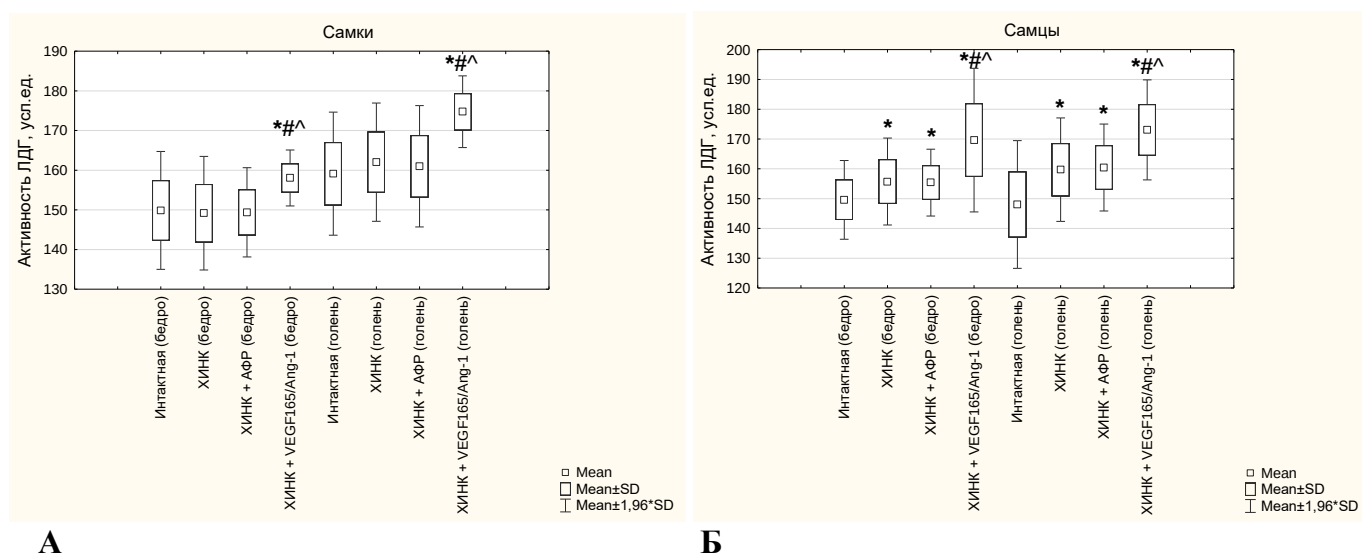


Рисунок 8. Активность лактатдегидрогеназы в скелетных мышцах нижней конечности крыс экспериментальных групп на 42-е сутки наблюдения. А – самки, Б – самцы. * – $p < 0,001$ по отношению к показателям интактной группы, # – $p < 0,001$ по отношению к показателям группы «ХИНК», ^ – $p < 0,001$ по отношению к показателям группы «ХИНК + АФР»

У самцов на **42-е сутки** мониторинга выявлена более выраженная активация гликолитических процессов по сравнению со здоровой конечностью: статистически значимое увеличение активности ЛДГ в мышечных клетках в группах «ХИНК» – в бедре на 4,1 %, в голени – на 7,9 %, «ХИНК + АФР» – в бедре на 3,9 %, в голени – на 8,4 %, «ХИНК + VEGF165/ Ang-1» – в бедре на 13,4 %, в голени – на 16,9 % ($p = 0,001$ для всех групп). По сравнению с группами с ишемией в группе «ХИНК + VEGF165/Ang-1» наблюдали повышение активности ЛДГ в бедре – на 8,9 % и 9,2 %, в голени – 8,4 % и 7,9 % ($p = 0,001$ для всех групп) (рисунок 8 Б).

Заключение. Применение генно-инженерной плазмидной конструкции pcDNA_VEGF165/Ang-1 в дозе 100 мкг/жив в условиях моделирования ишемии мышц конечности приводит к выраженной активизации ферментов энергетического обмена, статистически значимому повышению активности сукцинат- и лактатдегидрогеназы в клетках ишемизированной мышечной ткани лабораторных животных на 14-е сутки после терапии с последующей активацией процессов в цикле Кребса и гликолитическом пути к 42-ым суткам наблюдений.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что разработанная генно-инженерная плазмидная конструкция pcDNA_VEGF165/Ang-1 оказывает выраженное и пролонгированное цитопротективное действие, которое проявляется в способности индуцировать значимое повышение активности ферментов тканевого дыхания и гликолиза в клетках ишемизированной мышечной ткани лабораторных животных.

Литература:

- [1]. *Shahim B., Kapelios C.J., Savarese C., Lund L.H.* Global public health burden of heart failure: an updated review // *Card. Fail. Rev.* 2023. Vol. 9. e11. P. 1–8.
- [2]. *Deveza L., Choi J., Yang F.* Therapeutic angiogenesis for treating cardiovascular diseases // *Theranostics*. 2012; Vol. 2. № 8. P. 801–814.
- [3]. *Рубина К.А., Семина Е.В., Дыйканов Д.Т., Болдырева М.А. др.* Эффективность сочетанного использования плазмидных конструкций, содержащих гены HGF и ангиопоэтина-1, для восстановления кровотока в ишемизированных тканях // *Гены & Клетки*. 2018. Т. XIII. № 1. С. 56–64.
- [4]. *Калинин Р. Е., Шулькин А. В., Сучков И. А., Климентова Э. А. др.* Экспрессия сосудистого эндотелиального фактора роста в артериальной стенке при различной сосудистой патологии // *Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия*. 2020. Т. 13. № 6. С. 556–560.
- [5]. *Белоглазова И. Б., Зубкова Е. С., Дергилев К. В., Гольцева Ю. Д. др.* Эндотелиальные клетки контролируют рост сосудов, регулируя Notch-сигнализацию в мезенхимальных стромальных клетках / *Кардиологический вестник*. 2024. Т. 19. № 2. С. 32–38.
- [6]. *Gan Li, Junjie Gao, Peng Ding, Youshui Gao.* The role of endothelial cell–pericyte interactions in vascularization and diseases // *Journal of Advanced Research*. 2025 Vol. 67. P. 269–288.
- [7]. *Кутепов Д. Е., Жигалова М. С., Пасечник И. Н.* Патогенез синдрома ишемии-реперфузии // *Казанский медицинский журнал*. 2018. Т. 99. № 4. С. 640–644.
- [8]. *Кабак С. Л., Кузнецова Т. Е.* Влияние факторов окружающей среды на β -клетки островков Лангерганса поджелудочной железы новорожденных крыс // *Медицинский журнал*. 2011. № 2. С. 51–55.
- [9]. *Wu M.Y., Yiang G.T., Liao W.T., Tsai A.P.Y et al.* Current mechanistic concepts in ischemia and reperfusion injury // *Cell. Physiol. Biochem*. 2018. Vol. 46. № 4. P. 1650–1667.
- [10]. *Moosavi B., Berry E.A., Zhu X.-L., Yang W.-C. et al.* The assembly of succinate dehydrogenase: a key enzyme in bioenergetics // *Cell. Mol. Life Sci*. 2019. Vol. 76. № 20. P. 4023–4042.
- [11]. *Simard M.-L., Mourier A., Greaves L.C., Taylor R.W. et al.* A novel histochemistry assay to assess and quantify focal cytochrome c oxidase deficiency // *J. Pathology*. 2018. Vol. 245. № 3. P. 311–323.
- [12]. *Богдан В.Г., Доронькина А.С., Жаворонок И.П., Лепешко С.Г. др.* Антиноцицептивная эффективность использования комбинированной плазмидной конструкции pcDNA_VEGF165-Ang-1 у животных с экспериментальной ишемией задних конечностей // *Хирургия. Восточная Европа*. 2024. Т. 13. № 3. С. 363–371.
- [13]. *Богдан В.Г., Доронькина А.С., Жаворонок И.П., Фёдорова Е.В. др.* Патогенетическая модель хронической артериальной недостаточности кровоснабжения конечности в эксперименте // *Хирургия. Восточная Европа*. 2024. Т.13. № 1. С. 38–48.

**V. G. BOGDAN¹, E. V. FIODOROVA², T. A. FILIPOVICH²,
I. P. ZHAVORONOK², A. S. DORONKINA², S. G. LEPESHKO², S. V. MANKOVSKAYA²**

**ACTIVITY OF CELLULAR ENERGY METABOLISM ENZYMES DURING LOCAL USE OF
PLASMID CONSTRUCT VEGF165 / ANG-1 IN EXPERIMENTAL CHRONIC ISCHEMIA OF
LOWER LIMBS**

*¹Department of Medical Sciences of the National Academy of Sciences of Belarus,
Minsk, Republic of Belarus*

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

Summary

Application of genetically engineered plasmid construct pcDNA_VEGF165/Ang-1 at a dose of 100 µg/live in the model of chronic lower limb ischemia in rats leads to a pronounced activation of energy metabolism enzymes, statistically significant increase of succinate and lactate dehydrogenase activity in cells of ischemic muscle tissue of laboratory animals on the 14th day after therapy with subsequent activation of processes in Krebs cycle and glycolytic pathway by the 42nd day of observations. Thus, the developed genetically engineered plasmid construct pcDNA_VEGF165/Ang-1 has a pronounced and prolonged cytoprotective effect.

Keywords: chronic limb ischemia, gene therapy, vascular endothelial growth factor, angopietin-1, experiment, rats, histochemical analysis.

Д. В. ЛУЦКОВИЧ¹, А.-М. В. ЕРОФЕЕВА², М. А. КОРНЕЕВА², Е. С. ЛУЦКОВИЧ¹,
С. В. МАНЬКОВСКАЯ², Д. О. ДОРМЕШКИН³, А. Н. МЕЛЕШКО¹

ЭФФЕКТИВНОСТЬ АНТИ-GD2 CAR-T ТЕРАПИИ НЕЙРОБЛАСТОМЫ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

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

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

³ Государственное научное учреждение «Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси», г. Минск, Республика Беларусь

Цель – получить химерные антигенные рецепторы 2-го поколения и оценить их функциональную активность в сингенной мышинной модели нейробластомы для обоснования дальнейших клинических испытаний.

В данном исследовании в качестве мишеней для таргетирования CAR-T клетками были выбраны дисиаialogанглиозид GD2 и его ацетилированная форма. Внутривенная инфузия CAR-T клеток в терапевтической дозе ($7,5 \times 10^4$) независимо от типа применяемого антитела хорошо переносилась животными с экспериментальной нейробластомой. На 30 день обнаружены признаки регрессии сформированного опухолевого узла: дистрофия и апоптоз клеток, формирование полей некроза и развитие очагов грануляционной ткани. Отмечено, что контроль объема опухолевого узла был более выражен при использовании CAR-T 8B6-BBz.

Ключевые слова: нейробластома, сингенная модель, CAR-T.

Введение. Нейробластома (НБ) является наиболее распространенной внечерепной солидной опухолью у детей, на ее долю приходится 7 % всех детских новообразований у пациентов в возрасте до 15 лет и 15 % всех детских смертей от рака в мире. Это второй по распространенности тип детских солидных опухолей, уступающий только опухолям центральной нервной системы (ЦНС) и третий после лейкемии, опухолей головного мозга по уровню заболеваемости среди детских опухолевых заболеваний. Мировые показатели смертности составляют 0,85–1,1 случая на 100 000 детей в возрасте до 15 лет [1].

В последние годы были достигнуты определенные успехи в терапии НБ, в первую очередь за счет внедрения новых терапевтических подходов. Пациенты с нейробластомой группы низкого и среднего риска имеют благоприятный прогноз и пятилетнюю выживаемость более 90 %. Однако в случае нейробластомы группы высокого риска, которая выявляется примерно в 60 % случаев, прогноз остается неблагоприятным. Несмотря на агрессивную мультимодальную терапию, пятилетняя выживаемость остается ниже 50 % [2]. Химиотерапия, лучевая терапия и хирургические методы демонстрируют более низкую эффективность на поздних стадиях лечения заболевания при возникновении рефрактерности, а также обладают заметной токсичностью, в том числе возрастание риска возникновения вторичных опухолей.

Иммунотерапия представляет собой перспективный подход в лечении нейробластомы группы высокого риска. В настоящее время все больше популярность набирает терапия Т-лимфоцитами, экспрессирующими трансгенный рецептор Т-клеток или химерные антигенные рецепторы (CAR). Целевым антигеном для создания CAR-T терапии против нейробластомы является дисиаialogанглиозид GD2 который широко экспрессируется на поверхности этих клеток. Большинство клинических вариантов анти-GD2 CAR основаны на scFv 14.G2a, происходящем из химерного антитела 14.18 (денутуксимаб). Экспрессия GD2 очень типичная для

злокачественных нейробластом, но встречается и на периферических нервах, меланоцитах кожи, мозге и остеопрогениторах [3].

Одним из вариантов увеличения специфичности рецептора является таргетирование О-ацетил-GD2, производное дисиалоганглиозида, в котором внешний остаток сиаловой кислоты модифицирован О-ацетиловым эфиром. Ацетилирование GD2 происходит только в опухолевых клетках и не встречается в периферических нервах [4, 5]. Известно mAb 8B6 специфичное именно к О-ацетил-GD2, для которого показана диагностическая ценность в распознавании материала нейробластомы и меланомы методом иммуногистохимии [6]. Плотность экспрессии О-ацетил-GD2 на опухолевых клетках ниже, чем для GD2: от 10 % до 50 % молекул GD2 ацетилировано [7]. Таким образом, GD2 и О-ацетил GD2 являются подходящими мишенями для CAR-T терапии нейробластомы. Опубликованы результаты отдельных клинических испытаний для CAR-T на основе 14G2a, но пока отсутствуют данные по использованию антитела 8B6 в составе CAR [8]. Дизайны и результаты клинических испытаний CAR-T терапии для лечения нейробластомы исчерпывающе описаны в недавнем обзоре [9].

Доклинические исследования *in vivo* для новых методов клеточной терапии, в том числе CAR-T терапии, обычно требуются для обоснования клинических испытаний. Для CAR-T терапии наиболее распространены ксенографтные модели в иммунодефицитных мышах, которые позволяют испытывать CAR-T лимфоциты против опухолевых клеток человека. Сингенные, т.е. полностью мышинные модели, позволяют изучать отношения опухоли и CAR-T в контексте функциональной иммунной системы, естественного микроокружения опухоли. Сингенные модели имеют ряд недостатков и преимуществ, но остаются актуальной экспериментальной моделью этого вида терапии [10, 11].

Цель настоящего исследования: получить химерные антигенные рецепторы 2-го поколения и оценить их функциональную активность в сингенной мышинной модели нейробластомы для обоснования дальнейших клинических испытаний.

Материалы и методы исследования. Клеточные линии. В работе были использованы следующие иммортализованные клеточные линии: 293T (ATCC CRL-3216), полученной из клеток эмбриональных почек человека, для получения лентивирусных частиц и NXS2 клеточная линия мышинной нейробластомы GD2 положительная. Идентичность всех клеточных линий была проверена путем генотипирования STR полиморфизмов. Отсутствие контаминации микоплазмы контролировали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Экспериментальные животные. Исследование проведено на 20 мышах линии A/J в возрасте 6–8 недель. Мыши 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 (№ 1 от 26.01.23).

Сборка конструкции CAR. Сборка конструкций осуществлялась методом рестрикции и лигирования на основе вектора pCLNCX. Синтетические последовательности ДНК scFv и компонентов CAR были заказаны в компании Synbio Technologies (США). Собранные последовательности рецепторов были клонированы по сайтам рестрикции ClaI и HindIII (NEB) в вектор pCLNCX и трансформированы в компетентные клетки XL10 Gold. Полученные бактериальные колонии проверялись методом ПЦР с конструктор-специфичными праймерами. Плазмидную ДНК выделяли коммерческим набором NucleoBond® Xtra Maxi MN (Германия) из ночной культуры бактерий, содержащих полную последовательность клонированной конструкции. Проверку правильности собранной конструкции проверяли рестрикционным картированием плазмидной ДНК и с помощью автоматического секвенирования по Сэнгеру на генетическом анализаторе 3500 Applied Biosystems (Thermo Scientific, США) с использованием набора BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США).

Получение CAR-T клеток. В качестве исходного материала использовали фильтрат клеток из селезенки здоровой мыши. Фракцию мононуклеарных клеток выделяли путем центрифугирования на градиент плотности с подсчетом в растворе 3 % уксусной кислоты в камере Горяева и концентрировали до 1×10^6 /мл. Т-клетки выделяли путем негативной

иммуномагнитой селекции CD3⁺ клеток по инструкции набора EasySep™ Mouse T Cell Isolation Kit (StemCell Technologies, Канада), считали в камере Горяева количество и жизнеспособность клеток в 0,4 % растворе трипанового синего. Активация клеток перед трансдукцией обеспечивали магнитными частицами CD3/CD28 (Dynabeads™ Mouse T-Activator CD3/CD28, Thermo Fisher Scientific, США) в течение 48 часов в среде Gibco RPMI-1640 (Thermo Fisher Scientific, США) с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, США), 1х антибиотика-антимикотика, 500 IU ИЛ-2/мл, 50 μ M В-меркаптоэтанол, 1х раствора незаменимых аминокислот и 1х раствора пирувата натрия. Спустя 48 часов после активации производили ретровирусную трансдукцию Т-клеток при соотношении 1 мл вирусного супернатанта на 1×10^6 /мл Т-клеток на плашках, обработанных RetroNectin (TakaraClontech, США) со спинокуляцией. Через 24 часа клетки отмывали той же полной средой с цитокинами и продолжали инкубацию *in vitro* в течение 8–12 дней с контролем прироста клеток и экспрессии зеленого флуоресцентного белка (GFP) на 10–12 день. В экспериментах в качестве контроля использовали нетрансдуцированные активированные лимфоциты.

Модель мышинной опухоли. Приживление опухоли проводили однократно в область бедра путем подкожной инъекции суспензии клеток NXS2 в количестве $1,5 \times 10^6$ и в 300 мкл фосфатно-солевого буфера [8]. Для оценки динамики роста опухоли раз в 5 дней измеряли объем опухоли с помощью цифрового калипера для определения объема опухоли (ширина $\times$ длина $\times$ ширина $\times$ $\pi/6 = \text{мм}^3$).

Инфузия CAR-T клеток. CAR-T клетки вводили однократно в хвостовую вену. В качестве контроля эффективности использовали немодифицированные Т-клетки в количестве пропорционально введенных CAR-T.

Морфологические исследования. Для изучения морфологической характеристики опухоли выполняли вскрытие животных на 30 день после введения CAR-T клеток. Иссеченные опухолевые узлы фиксировали в 10 % нейтральном забуференном формалине в течение 24 часов с последующей заливкой парафин и изготовлением серийных срезов толщиной 3 мкм для обзорной микроскопии. Окрашенные гематоксилином и эозином препараты исследовали с помощью микроскопа Optec BK 5000 (КНР).

Результаты и их обсуждение. *Экспрессия GD2 на клетках NXS2.* Экспрессию GD2 на клеточной линии мышинной нейробластомы NXS2 оценили с помощью проточной цитометрии. Клеточная линия была на 95 % положительная по GD2 и при оценке была выявлена высокая интенсивность экспрессии ($\Delta\text{MFI} = 2 \times 10^5$, рисунок 1).

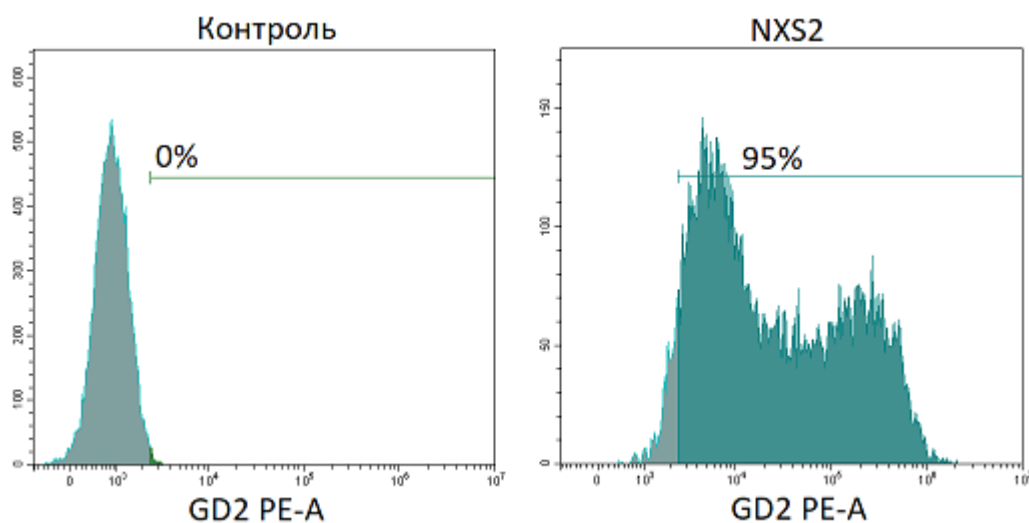


Рисунок 1. Экспрессия GD2 на клеточной линии нейробластомы мыши NXS2

Дизайн химерных антигенных рецепторов. Было разработано 2 варианта анти-GD2 конструкций CAR второго поколения, с включением в качестве антиген-распознающего домена scFv двух моноклональных антител – ch14.18 (scFv 14G2a) и 8B6. Все варианты рецепторов включали шарнирный регион IgG4, мышинный трансмембранный домен CD28TM, мышинный внутриклеточный костимуляторный домен 4-1BB и мышинный сигнальный домен CD3 ζ . (рисунок 2).

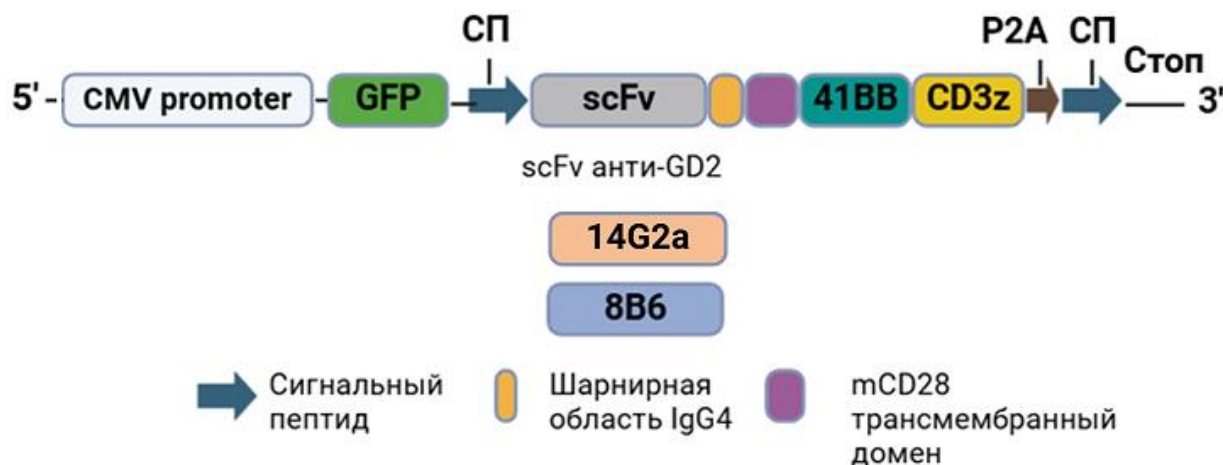


Рисунок 2. Схема конструкции анти-GD2 CAR используемых в этой работе

Проверка *in vitro* функциональной активности мышинных анти-GD2 CAR -T. Прямой цитотоксический тест проводили в соотношениях мишень: эффектор = 1 : 1 и 1 : 3 с двумя вариантами CAR-T. Для представления CAR-зависимой цитотоксичности конечные результаты рассчитывались как разница цитотоксической активности CAR-T и соответствующего ему нетрансдуцированному контролю (рисунок 3).

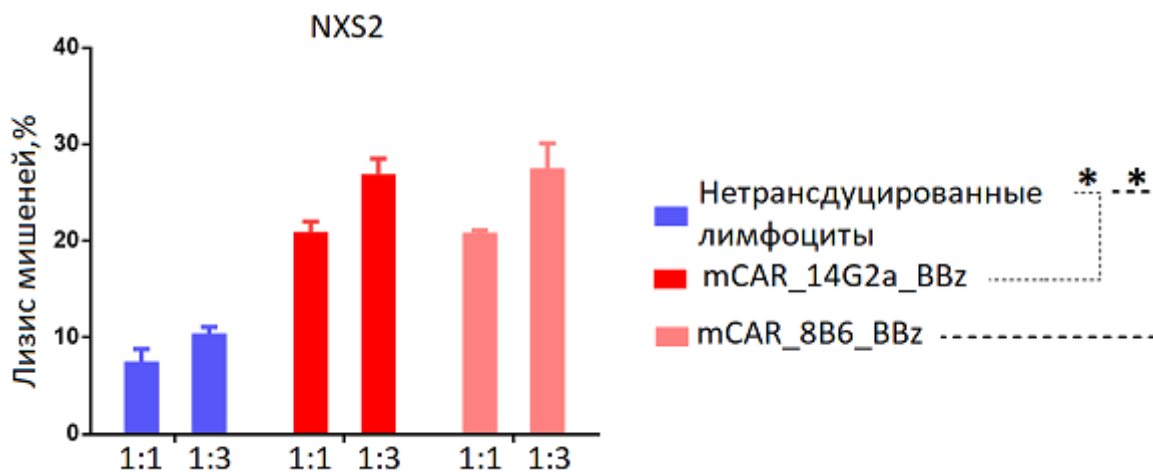


Рисунок 3. Сравнение цитотоксической активности двух вариантов CAR-T_Anti-GD2 против клеточной линии NXS2 в двух разных соотношениях; * – $p < 0,05$

Все варианты CAR-T показали выраженную дозозависимую цитотоксическую активность против GD2⁺ клеточной линии NXS2. Статистически значимых различий между рецепторами не наблюдали.

Проверка *in vivo* функциональной активности мышинного анти-GD2 CAR-T. В эксперимент было взято 20 мышей линии A/J. Две группы экспериментальные – по 4 самца и 4 самки в каждой, одна – контрольная (2 самца и 2 самки). Всем животным проведена прививка стандартной клеточной линии мышинной нейробластомы NXS2.

На 7 день после прививания опухоли всем подопытным произведена внутривенная инфузия циклофосфана (200 мг/кг).

На 11 день после прививания опухоли произведена внутривенная инфузия двух вариантов модифицированных лимфоцитов (CAR-T 14G2a-BBz и 8B6-BBz). Количество CAR-T на одну мышь составило $7,5 \times 10^4$. Объем вводимого клеточного биологического препарата составил 300 мкл. В качестве отрицательного контроля четырем подопытным мышам из каждой группы вводили активированные не модифицированные лимфоциты в количестве 1×10^6 на одну мышь (пропорционально рассчитанное количество, исходя из вводимой дозы CAR-T).

Для оценки динамики роста раз в 5 дней измеряли объем опухоли с помощью цифрового калипера. Результаты представлены на рисунке 4.

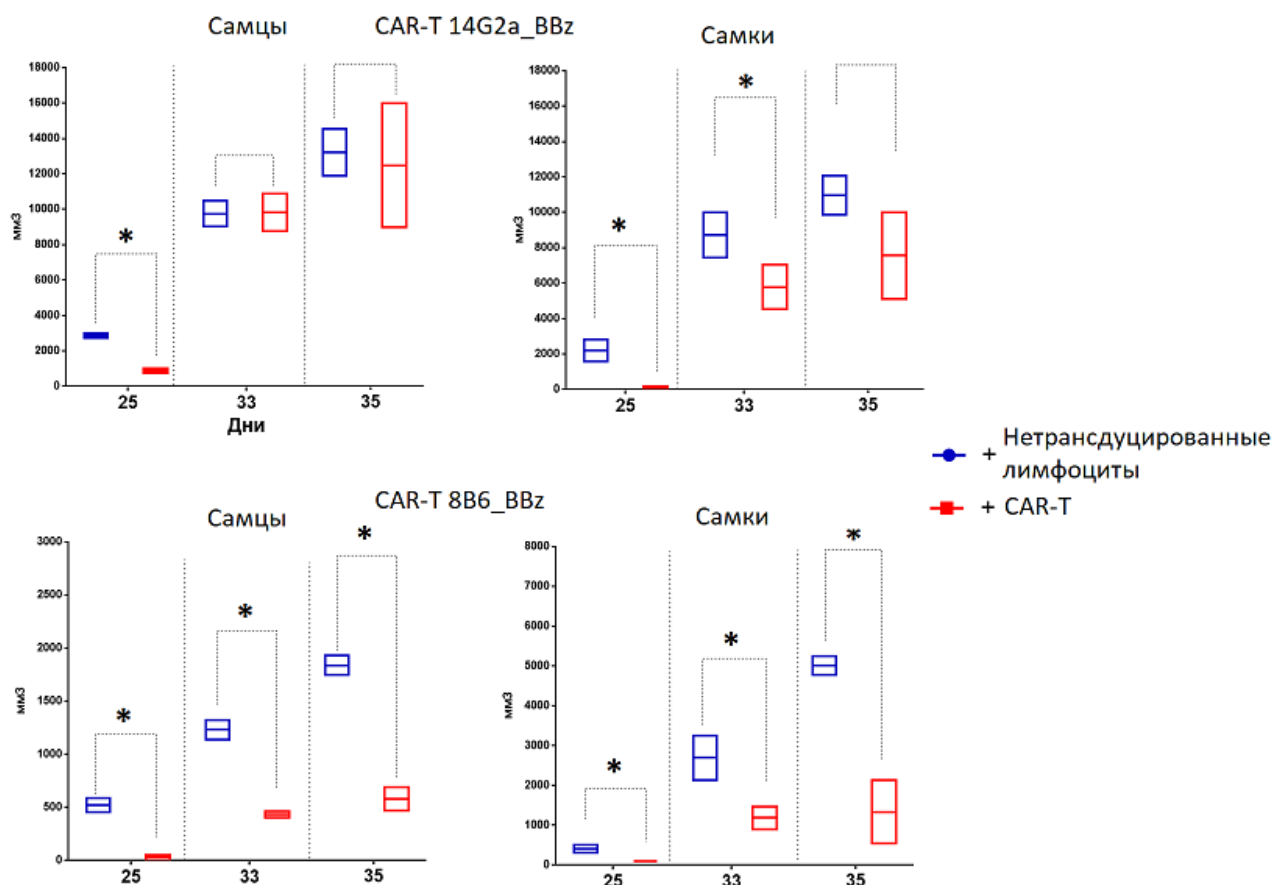
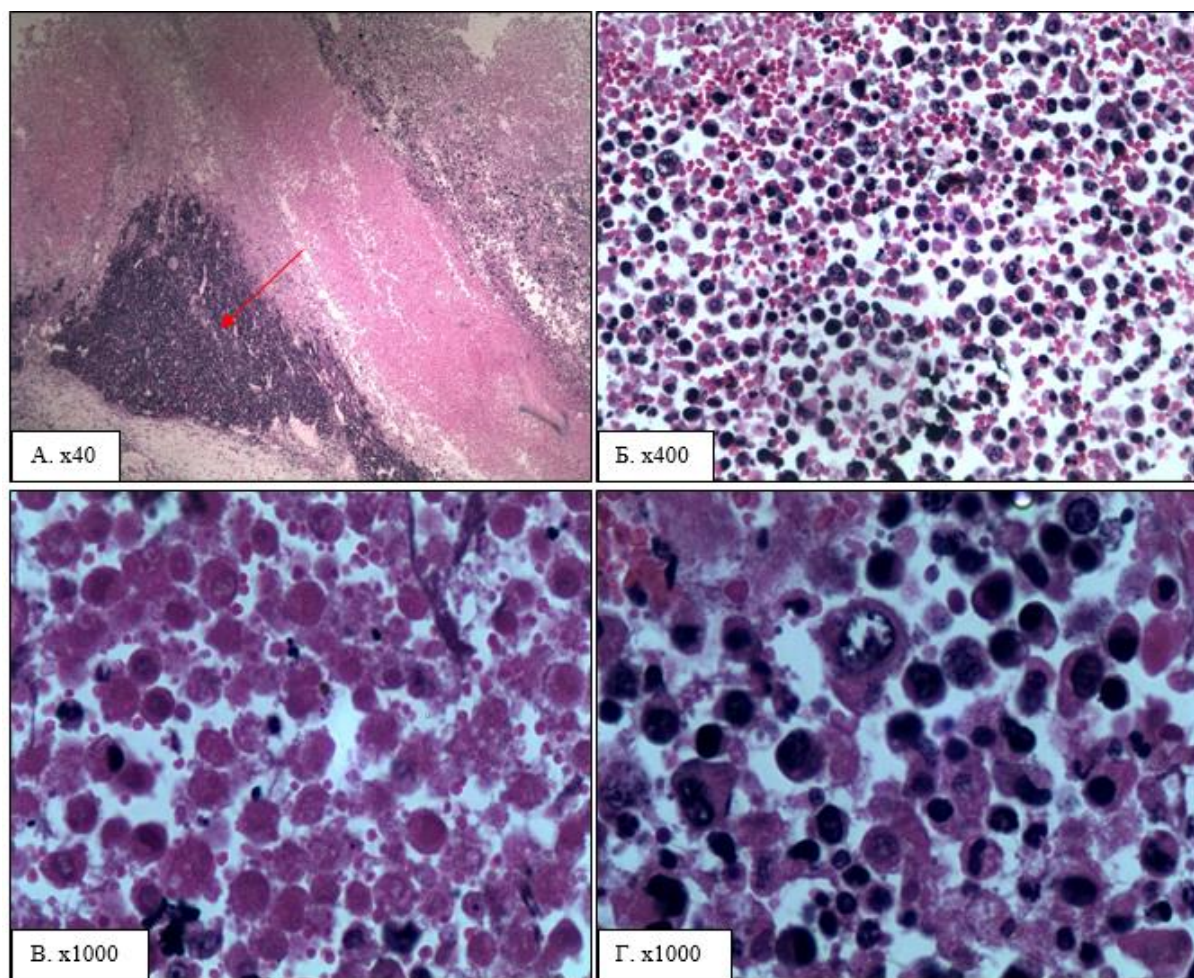


Рисунок 4. Сравнение цитотоксической активности двух вариантов CAR-T_Anti-GD2 против клеточной линии NXS2 в двух разных соотношениях; * – $p < 0,05$

Установлено, что оба варианта CAR-T клеток сдерживали рост опухолевого узла по сравнению с нередуцированными клетками. Примечательным является то, что CAR-T 14G2a-BBz лучше контролировал рост опухолевого узла у самок, до 30 дня, а CAR-T 8B6-BBz контролировал рост опухолевого узла одинаково для самцов и самок вплоть до 40 дня.

Таким образом, мы также предварительно ответили на вопрос, насколько высокую аффинность к антигену должен иметь CAR для реализации наибольшего эффекта. Известно, что наибольшей аффинностью обладает 14G2a ($KD=77\text{нМ}$ или 49 [12,13]), а антитело 8B6 обладает более низкой аффинностью ($KD=32$ [12]), но является более привлекательным из-за более высокой специфичности распознавания ацетилированной формы GD2, характерной для опухолевых клеток, но не периферических нервов [12].

На 30 день после введения CAR-T произвели морфологический анализ опухоли (рисунок 5).



А – обзорная микроскопия опухолевого узла, стрелкой указана жизнеспособная ткань;
Б, В, Г – цитология опухолевых клеток в зоне регрессии

Рисунок 5. Микроскопическая структура опухолевого узла на 30 день после введения клеток NXS2 и 14 день после введения CAR-T 8B6-BBz

Для всех вариантов CAR-T в центральных отделах опухоли наблюдали признаки регрессивных изменений, на долю которых приходится более 50 % всей площади: опухолевая паренхима сохранилась в виде разрозненных групп клеток или одиночных клеток с выраженными дистрофическими изменениями среди свободнолежащих эритроцитов. Присутствовали клетки с пикнотическими ядрами, клетки с фрагментированными по всей цитоплазме ядрами, местами с образованием клеток-теней. Также встречались единичные гигантские клетки с уродливыми гиперхромными ядрами или причудливыми ядерными образованиями. Митозы в клетках отсутствовали. Очагово прослеживалось разрастание грануляционной ткани.

Заключение. В данном исследовании в качестве мишеней для таргетирования CAR-T клетками были выбраны дисialogанглиозид GD2 и его ацетилированная форма. Внутривенная инфузия CAR-T клеток в терапевтической дозе ($7,5 \times 10^4$) независимо от типа применяемого антитела хорошо переносилась животными (отсутствовали визуальные побочные эффекты) с экспериментальной нейробластомой. На 30 день выявили признаки регрессивных изменений сформированного опухолевого узла. Контроль объема опухолевого узла был более выражен при использовании CAR-T 8B6-BBz.

Таким образом, в экспериментах *in vivo* установлен цитотоксический эффект CAR-T клеток различных модификаций в отношении первичного опухолевого очага нейробластомы и отсутствие кардинальных побочных эффектов, что является основой для проведения клинических испытаний этой клеточной терапии при данной патологии.

Литература:

- [1]. Maris J.M., Hogarty M.D., Bagatell R. et al. Neuroblastoma. *Lancet*. 2007. Vol. 369. № 9579. P.2106–2120.
- [2]. Whittle S.B., Smith V., Doherty E. et al. Overview and recent advances in the treatment of neuroblastoma. *Expert Review of Anticancer Therapy*. 2017. Vol. 17. № 4. P. 369–386.
- [3]. Nazha B., Inal C., Owonikoko T.K. Disialoganglioside GD2 Expression in Solid Tumors and Role as a Target for Cancer Therapy. *Front. Oncol*. 2020. Vol. 10. P. 1–15.
- [4]. Faraj S., Bahri M., Fougeray S. et al. Neuroblastoma chemotherapy can be augmented by immunotargeting O-acetyl-GD2 tumor-associated ganglioside. *Oncoimmunology*. 2018. Vol. 7. P. 1–13.
- [5]. Cavdarli S., Delannoy P., Groux-Degroote S. O-acetylated Gangliosides as Targets for Cancer Immunotherapy. *Cells* 2020. Vol. 9. P. 1–14.
- [6]. Alvarez-Rueda N., Desselle A., Cochonneau D. et al. A monoclonal antibody to O-Acetyl-GD2 ganglioside and not to GD2 shows potent anti-tumor activity without peripheral nervous system cross-reactivity. *PLoS One*. 2011. Vol. 6. P.1–12.
- [7]. Fleurence J., Fougeray S., Bahri M. et al. Targeting O-Acetyl-GD2 Ganglioside for Cancer Immunotherapy. *J. Immunol. Res*. 2017. Vol. 2017. № 5604891.
- [8]. Del Bufalo F., De Angelis B., Caruana I. et al. GD2-CART01 for Relapsed or Refractory High-Risk Neuroblastoma. *N. Engl. J. Med*. 2023. Vol. 388 № 14. P. 1284–1295.
- [9]. Lutskovich D., Meleshko A., Katsin M. State of the art and perspectives of chimeric antigen receptor T cells cell therapy for neuroblastoma. *Cytotherapy*. 2024. Vol. 26. № 10. P. 1122–1131.
- [10]. Duncan B.B., Dunbar C.E., Ishii K. Applying a clinical lens to animal models of CAR-T cell therapies. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2022. Vol. 30. № 27. P. 17–31.
- [11]. Д.В. Луцкович, А-М.В. Ерофеева, М.А. Корнеева и др. Сингенная модель нейробластомы // *Новости медико-биологических наук*. 2024 Т. 24. № 2. С. 40–46.
- [12]. Alvarez-Rueda N., Desselle A., Cochonneau D. et al. A monoclonal antibody to O-Acetyl-GD2 ganglioside and not to GD2 shows potent anti-tumor activity without peripheral nervous system cross-reactivity. *PLoS One*. 2011. Vol. 6. P. 1–12.
- [13]. Mao R., Kong W., He Y. The affinity of antigen-binding domain on the antitumor efficacy of CAR T cells: Moderate is better. *Front Immunol* 2022. Vol. 13. P. 1–15.

D. V. LUTSKOVICH¹, A.-M. V. YEROFEEVA², M. A. KORNEEVA², K. S. LUTSKOVICH¹,
S. V. MANKOVSKAYA², D. O. DORMESHKIN³, A. N. MELESHKO¹

A SYNGENEIC MOUSE MODEL OF ANTI-GD2 CAR-T THERAPY FOR NEUROBLASTOMA

¹ State Institution “Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology 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

³ State Scientific Institution “Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of
Belarus”, Minsk, Republic of Belarus

Summary

The aim was to obtain chimeric antigenic receptors of the 2nd generation and evaluate their functional activity in a syngeneic mouse model of neuroblastoma to justify further clinical trials.

In this study, disialoganglioside GD2 and its acetylated form were chosen as targets for CAR-T cell targeting. Intravenous infusion of CAR-T cells at a therapeutic dose (7.5×10^4) regardless of the type of antibody used was well tolerated by animals with experimental neuroblastoma. On the 30th day signs of regression of the formed tumor node were detected: dystrophy, apoptosis of cells, formation of necrosis fields and development of granulation tissue foci. Regressive changes accounted for 50 % to 70 % of the tumor tissue, the severity of morphological signs gradually decreased from the center to the periphery of the neoplasm. It was noted that control of tumor node volume was more pronounced with CAR-T 8B6-BBz.

Keywords: neuroblastoma, syngeneic model, CAR-T.

П. А. ХМАРСКИЙ¹, С. А. ГОЛУБЕВА¹, Е. В. ЛЕМЕШКО², С. В. ГУБКИН²

ОБНАРУЖЕНИЕ ФАЗ ШАГА ПАЦИЕНТА ПО ДАННЫМ ИНЕРЦИАЛЬНОГО ИЗМЕРИТЕЛЬНОГО МОДУЛЯ

¹ Государственное научное учреждение «Институт прикладной физики Национальной академии наук Беларуси», г. Минск, Республика Беларусь

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

Представлен анализ методов обнаружения фаз шага на основе данных инерциальных измерительных модулей, закрепленных на стопах пациента. Исследование включает сравнение эффективности акселерометров и гироскопов, изучение методов фильтрации сигналов и определение оптимальных пороговых значений для выделения фаз шага. Применение двусторонней фильтрации Баттерворта и закрепление сенсоров в области подъема стопы позволило улучшить точность и стабильность алгоритмов обработки данных. Предложенная методика может быть использована в режиме реального времени для мониторинга и реабилитации пациентов, включая интеграцию с медицинскими костюмами.

Ключевые слова: обнаружение шага, инерциальные измерительные модули, акселерометр, гироскоп, реабилитация, медицинские костюмы.

Введение. В современной медицинской практике все больше внимания уделяют объективной оценке двигательной активности человека с использованием инструментальных методов исследования [1, 2]. Одним из приоритетных направлений является анализ параметров походки, который особенно важен для мониторинга и реабилитации пациентов после травм и заболеваний опорно-двигательного аппарата [3, 4]. Разработка алгоритмов обнаружения фаз шага на основе данных инерциальных измерительных модулей (ИИМ) продолжает оставаться актуальной исследовательской задачей. Существующие методы [5, 6, 7] демонстрировали высокую эффективность при относительно низкой вычислительной сложности, однако требуют дальнейшей проработки для применения в реальных условиях, включая оптимизацию параметров фильтрации и пороговых значений.

Использование медицинских костюмов с интегрированными ИИМ, таких как *Teslasuit* [8, 9], представляется перспективным для высокоточной регистрации и анализа движений. Точное определение фаз шага позволяет улучшить синхронизацию терапевтических процедур, например, функциональной электрической стимуляции (FES) [10, 11], минимизировать погрешности акселерометров [12, 13] и улучшить надежность оценки походки.

Современные подходы включают использование методов глубокого обучения [14] и анализ влияния размещения сенсоров на точность оценки параметров походки [15].

Целью настоящего исследования является разработка и экспериментальная проверка алгоритма автоматического обнаружения фаз шага по данным инерциальных измерительных модулей, установленных на стопах пациента. Задачи работы включают анализ влияния различных методов цифровой фильтрации сигналов акселерометра на качество выделения фаз шага, а также оценку возможности применения предложенного алгоритма в режиме реального времени.

Материалы и методы исследования. Для проведения экспериментальных исследований использовали 2 типа ИИМ: *ICM-20948* и *BNO085*. Данные модули были закреплены на стопах пациента в области подъема для точной фиксации динамики движений ступней. По результатам тестирования для построения алгоритма и получения экспериментальных данных, представленных в работе, использовались данные,

зарегистрированные с использованием модуля ICM-20948 за счёт его низкого уровня шума и высокой частоты дискретизации (до 1000 Гц). Модуль BNO085 применялся для проверки воспроизводимости результатов, а также для верификации работы алгоритма на оборудовании с иной архитектурой сенсоров и встроенной фильтрацией. Последующий анализ результатов и иллюстрированные примеры графиков фаз шага получены с использованием модуля ICM-20948.

Модуль ICM-20948 представляет собой компактное устройство, в состав которого входит трехосевой акселерометр, гироскоп и магнитометр [16]. Встроенные сенсоры позволяют измерять линейные ускорения (в пределах от $\pm 2g$ до $\pm 16g$), угловую скорость (± 250 , ± 500 , ± 1000 , ± 2000 °/с) и определять ориентацию при частоте дискретизации до 1000 Гц [16]. Особенностью данного модуля является низкий уровень шума, что позволяет фиксировать даже незначительные изменения движений пациента.

Модуль BNO085 содержит интеллектуальные алгоритмы обработки сигналов, что повышает точность оценки положения пациента и исключает систематические ошибки [17]. Технология Fusion Algorithms, встроенная в модуль, обеспечивает стабилизацию измерений в режиме реального времени. Характеристики модуля включают заявленную точность по крену и тангажу (менее 0,5 °), угловую точность курса (1 °) и частоту обновления данных до 200 Гц [17]. Указанные показатели особенно актуальны при проведении экспериментальных исследований на участниках с нарушениями походки.

Перед проведением исследования была выполнена процедура калибровки: нивелирована гравитационная составляющая сигналов акселерометра и компенсирован эффект дрейфа гироскопов, что обеспечило воспроизводимость данных при длительных экспериментах. Кроме того, модули были герметично упакованы для защиты от воздействия внешней среды, что особенно важно при продолжительных исследованиях или в условиях, предъявляющих повышенные требования к сохранению точности данных.

Результаты и их обсуждение. Проведен ряд экспериментов, направленных на оценку эффективности предложенных алгоритмов выделения фаз шага по данным инерциальных измерительных модулей. Ниже приведены основные результаты, иллюстрирующие поведение сигналов датчиков при использовании различных методов фильтрации и особенности работы алгоритма в типичных условиях регистрации движений. Обсуждение полученных данных позволяет определить преимущества выбранных подходов и выявить направления для дальнейшего совершенствования системы регистрации фаз шага.

На рисунке 1 представлены фазы шага (начальный контакт, средняя фаза, конечный контакт) и соответствующие им изменения сигналов, зафиксированных инерциальными измерительными модулями. Каждый этап шага показан графически в связке с временными изменениями сигналов акселерометра и гироскопа.

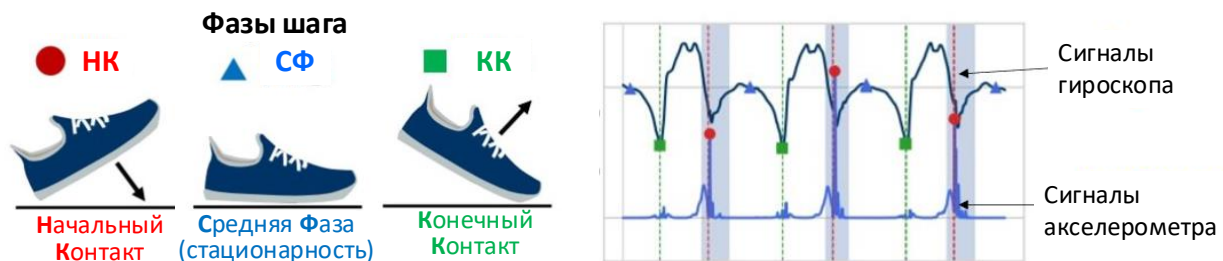


Рисунок 1. Фазы шага и сигналы датчиков ИИМ

Выделяют 3 основные фазы шага, связанные с контактом стопы с поверхностью земли:

1. НК (начальный контакт), также известный как «Initial Contact» согласно терминологии D. A. Winter, представляет момент, когда пятка впервые касается поверхности [1]. НК ассоциируют с начальной фазой нагрузочного ответа, и на графике он проявляется резким пиковым значением сигналов акселерометра и гироскопа.

2. *СФ (средняя фаза, стационарность)*, которая в зарубежной литературе называется «*Mid-Stance*» или «*Foot Flat*», отражает стадию полной опоры стопы на поверхность. В ней сигналы акселерометра сглаживаются из-за сниженной динамики и стабилизации положения.

3. *КК (конечный контакт)*, известный как «*Terminal Stance*» (или «*Toe Off*»), связан с моментом, когда стопа начинает отрываться от поверхности, переходя к фазе переноса, что сопровождается еще одним ростом в сигналах, фиксируемых гироскопом, и уменьшением значений акселерометра.

Также на рисунке 1 представлены графики сигналов гироскопа и акселерометра ИИМ, фиксирующие данные в процессе одного цикла шага. Сигналы гироскопа отражают угловую скорость, а акселерометр – изменения линейных ускорений. Красные, синие и зеленые маркеры на графике обозначают моменты, соответствующие началу, середине и завершению контакта стопы с поверхностью земли, что позволяет визуализировать временную структуру этого процесса.

Рисунок демонстрирует, как использование ИИМ позволяет детально фиксировать каждую фазу шага, что наглядно показывает потенциал применения таких систем для анализа биомеханики движений в режиме реального времени.

Размещение ИИМ на стопах пациента обусловлено прежде всего необходимостью точного анализа фаз шага на основе данных силы и динамики контакта стопы с опорной поверхностью. Такое расположение соответствует ряду ключевых особенностей биомеханики движения: именно движение стоп является индикатором начального и завершающего контактов, которые критически важны для выделения фаз шага. Размещение ИИМ на стопах позволяет минимизировать ошибки при обнаружении фаз шага, так как указанные части организма человека обеспечивают прямой доступ к динамическим изменениям параметров ускорения и угловой скорости в процессе ходьбы.

Более того, расположение датчиков именно на подъеме стопы обеспечивает стабильность крепления и точность регистрации данных даже при высокой двигательной активности. Результаты исследований показывают, что такая установка эффективна для устранения систематических ошибок гироскопов и для минимизации отклонений, вызванных общими движениями тела, которые могли бы исказить расчеты, если ИИМ был бы размещен в других зонах (например, на бедре или туловище). Приведенная методика также позволяет синхронизировать данные с другими сенсорами, используемыми в медицинских костюмах, что открывает широкие возможности для реабилитации и мониторинга пациентов в режиме реального времени.

На рисунке 2 уточнены различия в обработке сигналов акселерометра и гироскопа для задачи обнаружения шага и обоснован выбор сигнала акселерометра в качестве основного параметра.

Сигнал акселерометра демонстрирует высокую четкость и выраженность пиков, соответствующих активным фазам шага. После фильтрации удастся минимизировать шумы и выделить ключевые моменты ускорения, связанные с началом и завершением движения стопы, что упрощает задачу обнаружения фаз шага и повышает точность алгоритма.

Сигнал гироскопа более чувствителен к вращательным движениям и отклонениям, вызванным наклоном стопы в процессе ходьбы. Однако он менее информативен для определения начала и конца контакта стопы с опорой, что приводит к усложнению расчета и увеличению погрешностей при попытке выделить фазы шага исключительно по данным гироскопа.

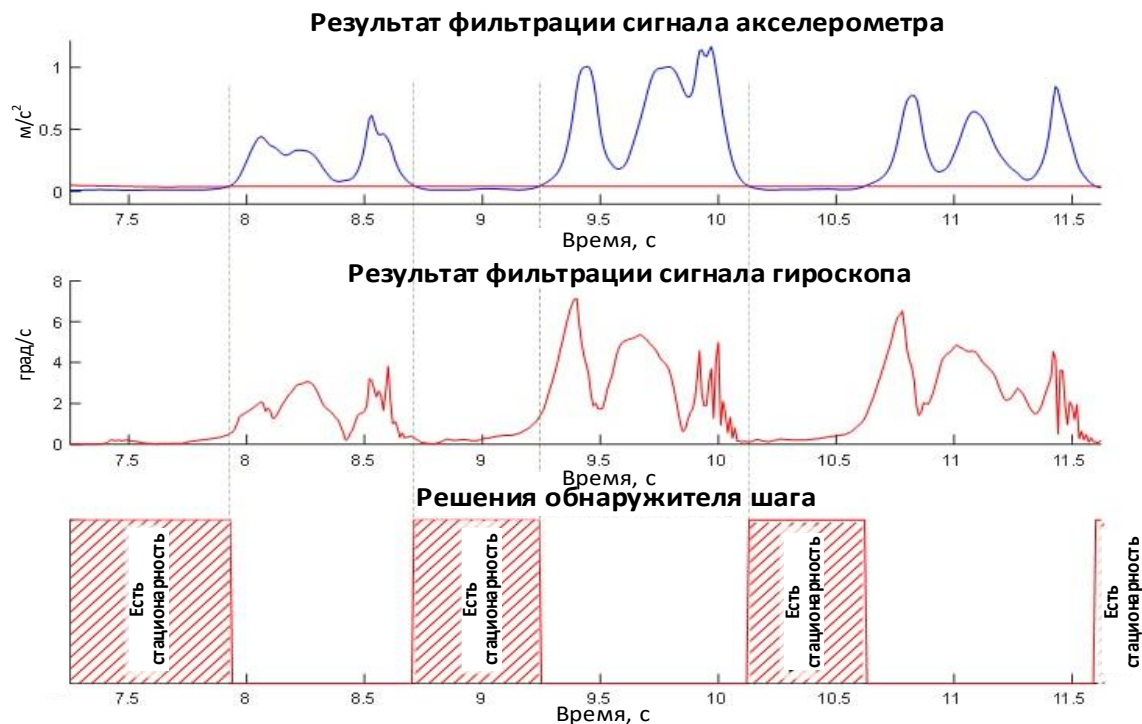


Рисунок 2. Сигналы датчиков инерциального измерительного модуля в процессе ходьбы

На основании анализа сигналов установлено, что акселерометр обеспечивает более четкое разделение фаз шага и имеет меньшую подверженность систематическим ошибкам и дрейфу, характерным для гироскопа. Таким образом, использование акселерометра в качестве основного сенсора для обнаружения шагов не только упрощает обработку данных, но и повышает точность алгоритма его выявления.

На рисунке 3 представлена технология реализации алгоритма обнаружения шага на основе данных акселерометра ИИМ, закрепленного на стопе. Структурная схема отображает последовательность обработки сигналов акселерометра. На вход поступает трехосевой сигнал ускорений, который преобразуется в норму ускорения и затем проходит через 3 основных этапа:

1. *Фильтрация высоких частот (ФВЧ):* устраняет низкочастотные составляющие сигнала, вызванные медленными движениями (например, гравитацией) или шумами.
2. *Фильтрация низких частот (ФНЧ):* исключает высокочастотные шумы, сохраняя важные для анализа изменения сигнала.
3. *Пороговое устройство:* применяют для выявления значительных изменений в сигнале, которые соответствуют фазам шага. Если его значение превышает порог, фиксирует событие «Шаг».

В результате обработки полученные данные передают на выход обнаружителя, где формируют бинарные решения относительно каждой фазы движения: «Есть шаг» или «Есть стационарность».

На рисунке 3 Б показан пример временного ряда, иллюстрирующий обработку сигнала акселерометра на различных этапах алгоритма обнаружения шага:

1. *График 1:* исходная норма сигнала акселерометра представляет собой «сырые» данные ускорений без фильтрации. Видны неоднородные колебания, обусловленные движениями и шумами.
2. *График 2:* после ФВЧ низкочастотные компоненты удаляют, выделяя быстрые изменения, связанные с фазами шага.
3. *График 3:* после ФНЧ сигнал сглаживается, устраняют высокочастотные шумы. Полученные пики точно соответствуют фазам шага.

4. *График 4*: выходной сигнал порогового устройства отображает решения алгоритма: «Есть активность» или «Есть стационарность».

Представленный алгоритм эффективно сегментирует данные акселерометра, позволяя точно обнаруживать фазы шага в режиме реального времени. Четкость пиков в обработанном сигнале делает его пригодным для дальнейших фазометрических расчетов. Логичное следование этапам фильтрации обеспечивает устойчивость алгоритма и минимизацию ошибок.

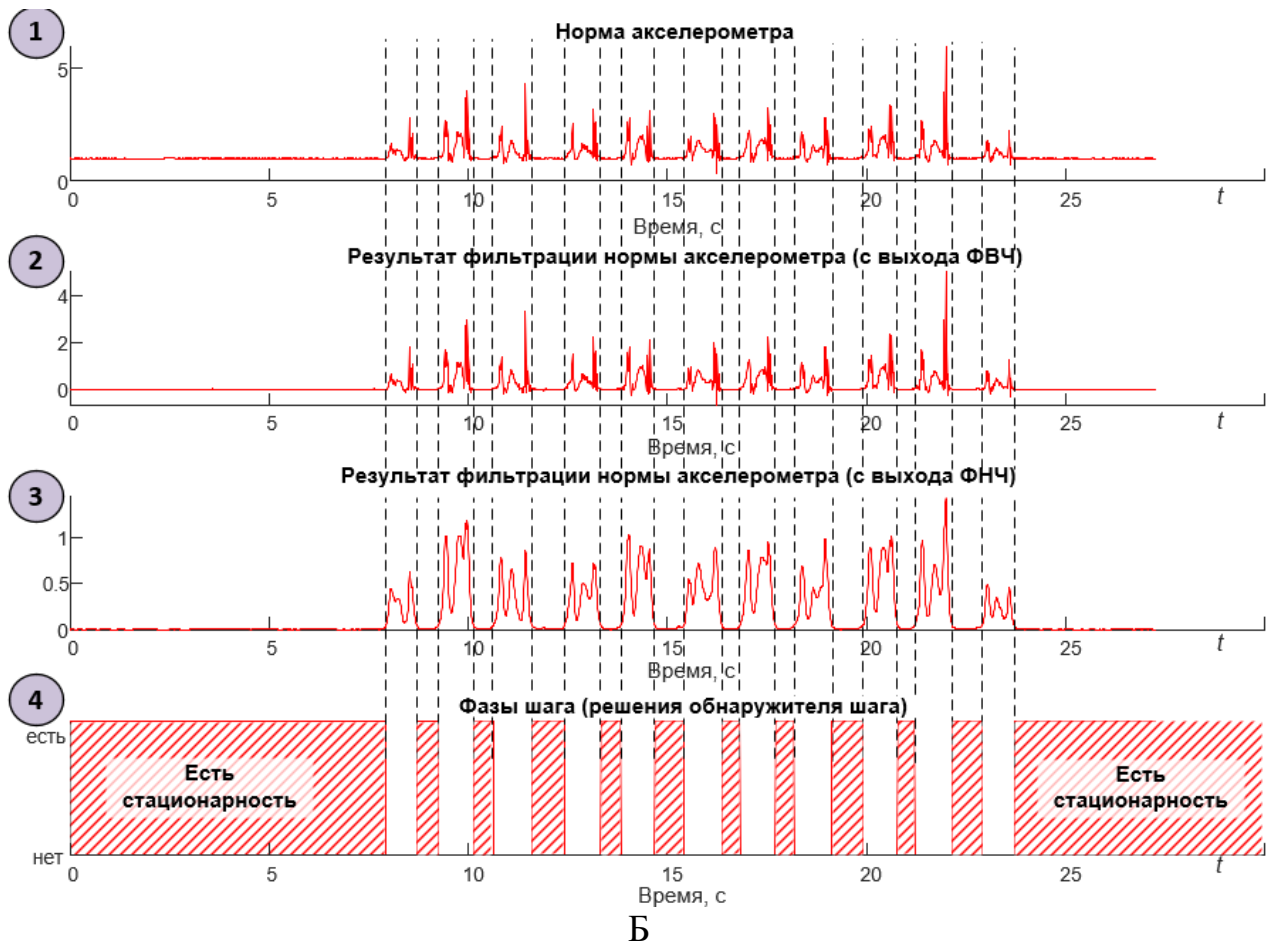
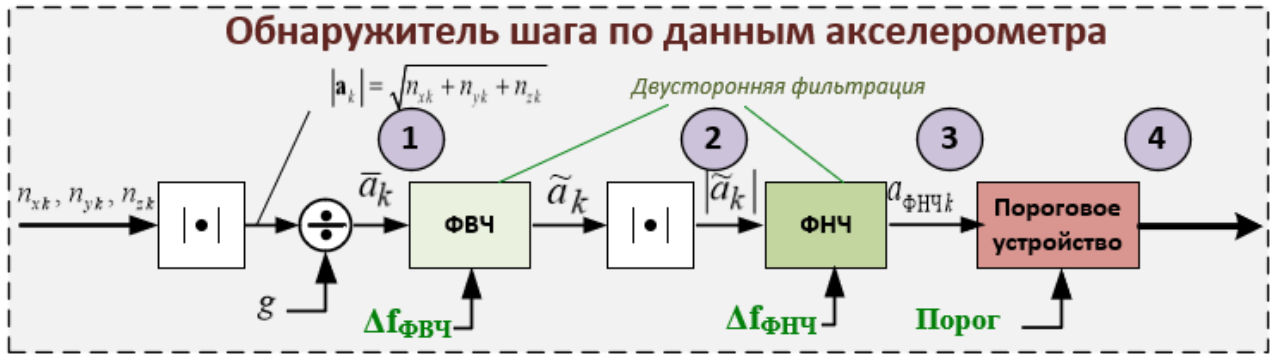


Рисунок 3. Обнаружитель шага по данным трехосевого акселерометра, закрепленного на стопе: структурная схема (а); временные диаграммы сигналов на различных этапах обработки сигналов акселерометра (б)

На рисунке 4 показаны результаты обработки сигнала акселерометра с использованием двусторонней фильтрации, реализованной через фильтры низких и высоких частот Баттерворта, и сравнение с односторонней фильтрацией. Основное внимание уделено преимуществам двустороннего подхода для точного обнаружения фаз шага.

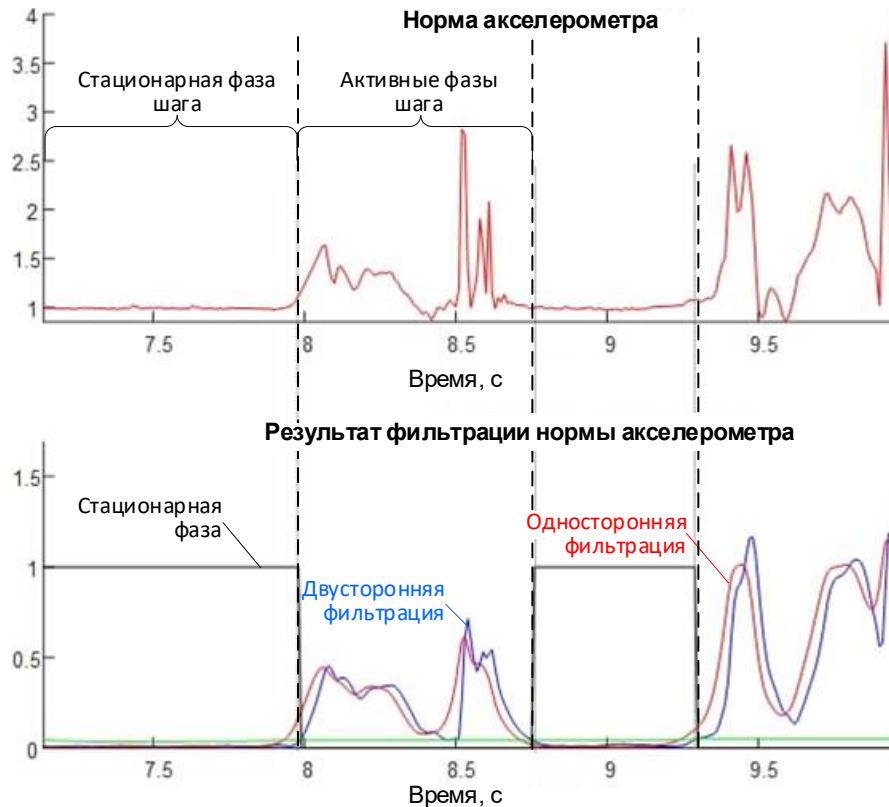


Рисунок 4. Пояснение преимуществ двусторонней фильтрации по сравнению с односторонней при обработке данных акселерометра на примере шага пациента

На рисунке 4 продемонстрирована норма сигнала акселерометра, где можно выделить 2 ключевые фазы – стационарную фазу шага (участки со стабильными и низкоамплитудными значениями) и активную фазу шага (участки с резкими изменениями и пиками). Однако исходный сигнал содержит низкочастотные компоненты, такие как гравитационная составляющая, а также шумы, усложняющие анализ. В процессе обработки сигнала акселерометра были использованы 2 подхода:

1. *Односторонняя фильтрация (обозначена красным):* приводит к фазовым искажениям, из-за которых пики сигнала теряют точную временную привязку к реальным событиям шагов (например, начало или окончание фаз). Такая фильтрация может снизить точность обнаружения фаз шага.

2. *Двусторонняя фильтрация Баттерворта (обозначена синим):* обеспечивает сохранение временной привязки сигнала к реальным событиям. Благодаря обработке сигнала в прямом и обратном направлениях устраняются фазовые искажения, а структура сигнала становится сглаженной, что позволяет четко выделить пики, соответствующие началу и окончанию фаз шага.

В приведённой выше классификации под *односторонней фильтрацией* понимается классическая фильтрация сигнала только в прямом направлении по временной оси – от первого отсчёта к последнему. Такой подход может приводить к фазовым искажениям: отклонению во времени пиков и характерных событий сигнала относительно реальных моментов фаз шага.

В отличие от этого, *двусторонняя фильтрация* подразумевает применение фильтра последовательно в двух направлениях: сначала в прямом, затем в обратном по временной оси. Это реализуется, например, через функцию `filtfilt` в MATLAB или SciPy (Python). Такой метод исключает фазовые искажения и обеспечивает совпадение выделенных событий с реальными временными точками фаз шага, что критически важно для точности анализа.

Таким образом, под «обработкой сигнала в прямом и обратном направлениях» подразумевается двукратное последовательное применение фильтра, направленное на повышение точности выделения ключевых моментов сигнала.

Двусторонний подход в сочетании с фильтрами Баттерворта дает ключевые преимущества: точное выделение движения, минимизацию влияния шума и гравитационных составляющих, а также исключение смещения сигналов. Данные характеристики делают его особенно эффективным для анализа походки, где точное определение этапов движения является приоритетной задачей.

На рисунке 5 показано влияние порядка фильтра Баттерворта на качество обработки сигнала акселерометра для обнаружения шага. Сигнал представляет собой норму ускорения, в которой видны пики, связанные с фазами шага, и периоды стационарности. Для устранения шумов и сохранения ключевых особенностей сигнала применяли фильтрацию.

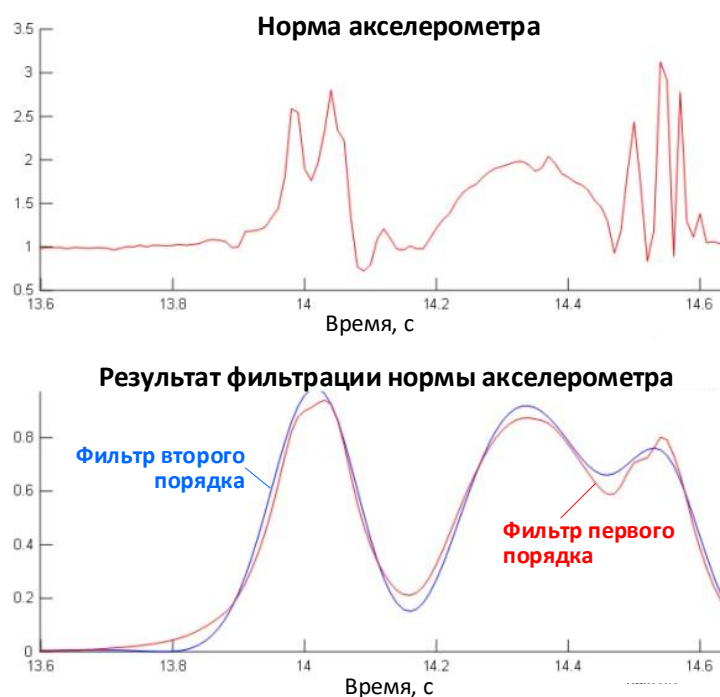


Рисунок 5. Сравнение результатов применения фильтров первого и второго порядка при обработке нормы акселерометра для обнаружения шага

На рисунке 5 представлены результаты фильтрации нормы акселерометра с использованием фильтров первого (красная линия) и второго порядка (синяя линия). Видно, что фильтр второго порядка обеспечивает более гладкую форму выходного сигнала по сравнению с фильтром первого порядка, позволяя точнее выделять основные фазы шага. Использование фильтра второго порядка способствует снижению амплитуды шумов и случайных выбросов, что повышает надёжность обнаружения характеристических особенностей походки.

Таким образом, разработанная методика обнаружения фаз шага на основе данных ИИМ успешно сочетает преимущества акселерометров и фильтрации сигналов, что позволяет добиться высокой точности выделения фаз шага, минимизировать влияние шума и систематических ошибок, а также обеспечить стабильность системы в условиях высокой динамической активности. Использование двусторонней фильтрации Баттерворта и оптимальное

расположение сенсоров на стопе обеспечивают надежность и воспроизводимость результатов. Предложенные подходы являются перспективными для применения как в реабилитационных системах с интеграцией дополнительных сенсоров, так и в задачах мониторинга двигательной активности пациентов в режиме реального времени.

Заключение. В результате проведенного исследования были разработаны и протестированы алгоритмы обнаружения фаз шага на основе данных инерциальных измерительных модулей, закрепленных на стопах пациента. Предложенный подход, включающий использование акселерометров и методов фильтрации Баттерворта второго порядка, позволил минимизировать шумы и систематические ошибки, обеспечив точную сегментацию фаз шага. Оптимальное расположение сенсоров в области подъема стопы обеспечило стабильность данных и возможность их применения даже при высокой двигательной активности.

Результаты экспериментов свидетельствуют о том, что акселерометр обладает значительными преимуществами по сравнению с гироскопом для задач обнаружения шага благодаря его высокой чувствительности к линейным ускорениям, критически важным для определения начальных и завершающих фаз контакта стопы с поверхностью. Реализация предложенного алгоритма позволяет эффективно обрабатывать данные в режиме реального времени, что открывает перспективы для внедрения методики в медицинские системы мониторинга и реабилитации, включая интеграцию с распределенными сенсорными системами, такими как медицинские костюмы.

Направлениями дальнейших исследований являются оптимизация выбора частотных параметров фильтров и пороговых значений для выделения фаз шага, а также повышение универсальности алгоритма при использовании на различных группах пациентов и типах сенсорных устройств.

Литература:

- [1]. Winter D.A. Biomechanics and motor control of human movement. Fourth Edition. John Wiley & Sons, 2009. 370 p.
- [2]. Yang C.C., Hsu Y.L. A review of accelerometry-based wearable motion detectors for physical activity monitoring // *Sensors*. 2010. Vol. 10. P. 7772–7788.
- [3]. Dijkstra B., Zijlstra W., Scherder E. et al. Detection of walking periods and number of steps in older adults and patients with Parkinson's disease: accuracy of a pedometer and an accelerometry-based method // *Age and Ageing*. 2008. Vol. 37. P. 436–441.
- [4]. Foster R.C., Lanningham-Foster L.M., Manohar C. et al. Precision and accuracy of an ankle-worn accelerometer-based pedometer in step counting and energy expenditure // *Prev. Med.* 2005. Vol. 41. P. 778–783.
- [5]. Munoz Diaz E., Mendoza-Silva G.M., Iglesias Perez F. et al. Step Detector and Step Length Estimator for an Inertial Pocket Navigation System // *International Conference on Indoor Positioning and Indoor Navigation*. Busan, 2014. P. 105–110.
- [6]. Wang Z., Zhao H., Qiu S. et al. Stance-Phase Detection for ZUPT-Aided Foot-Mounted Pedestrian Navigation System // *IEEE/ASME Trans. Mechatronics*. 2015. Vol. 20. P. 2661–2669.
- [7]. Renaudin V., Susi M., Lachapelle G. Step length estimation using handheld inertial sensors // *Sensors*. 2012. Vol. 12. P. 8507–8525.
- [8]. Хмарский П.А., Голубева С.В., Лемешко Е.В. и др. Использование в медицинских исследованиях тактильного костюма Teslasuit с системой инерциального захвата движения // *Неразрушающий контроль и диагностика*. 2024. № 2. С. 41–52.
- [9]. Technical specification – teslasuit. URL: <https://teslasuit.io/wp-content/uploads/TS-specs.pdf> (date of access: 06.05.2024).
- [10]. Xu L., Yang F., Li J. et al. Wearable Continuous Gait Phase Estimation During Walking, Running, Turning, Stairs, and Over Uneven Terrain // *IEEE Trans. Med. Robot. Bion.* 2024. Vol. 6. P. 1135–1146.
- [11]. El-Gohary M., Pearson S., McNames J. et al. Wearable Gait Analysis: Clinical Impact and Practical Considerations for Clinical Implementation // *Sensors*. 2023. Vol. 23. P. 4228.
- [12]. Luo B., Yang F., Wang W. et al. Algorithm for Gait Parameters Estimation Based on Heel-Mounted Inertial Sensors // *IEEE Sens. J.* 2024. Vol. 24. P. 24723–24736.

- [13]. Roetenberg D., Luinge H., Slycke P. Xsens MVN: Full 6DOF Human Motion Tracking Using Miniature Inertial Sensors // XSENS TECHNOLOGIES. 2013. № 3. P. 1–9.
- [14]. Lucot Q., Clavel D., Azevedo Coste C. et al. Multi-Activity Step Counting Algorithm Using Deep Learning Foot Flat Detection with an IMU Inside the Sole of a Shoe // Sensors. 2024. Vol. 24. P. 6927–6942.
- [15]. Pacini Panebianco G., Bisi M.C., Stagni R. Analysis of the Performance of 17 Algorithms from a Systematic Review: Influence of Sensor Position, Analysed Variable and Computational Approach in Gait Timing Estimation from IMU Measurements // Gait Posture. 2018. Vol. 66. P. 76–82.
- [16]. TDK InvenSense. ICM-20948 Datasheet: 9-Axis MEMS MotionTracking™ Device. 2023. URL: <https://invensense.tdk.com/products/motion-tracking/9-axis/icm-20948/> (дата обращения: 11.04.2025).
- [17]. Hillcrest Laboratories. BNO080/BNO085 Datasheet: Intelligent 9-Axis Motion Sensor. 2023. URL: <https://hillcrestlabs.com/products/sensors/bno080-085> (дата обращения: 11.04.2025).

P. A. KHMARSKY¹, S. A. GOLUBEVA¹, S. V. GOUBKIN², Y. V. LEMESHKO²

PATIENT STEP DETECTION BY DATA OF INERTIAL MEASUREMENT MODULES

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

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

Summary

The article analyzes methods for detecting gait phases based on the data from inertial measurement modules (IMUs) fixed on patients' feet. The study compares the efficiency of accelerometers and gyroscopes, explores signal filtering techniques, and determines optimal thresholds for gait phase detection. Applying Butterworth bilateral filtering and positioning sensors in the foot's instep region improved the accuracy and stability of data processing algorithms. The proposed methodology enables real-time application in-patient rehabilitation and monitoring, including integration with wearable medical suits.

Keywords: gait detection, inertial measurement modules, accelerometer, gyroscope, rehabilitation, wearable medical devices.

А. Е. БАРТОШ

ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ ЛЕПТИНА В НОРМЕ И ПРИ ОЖИРЕНИИ: ВЛИЯНИЕ НА КОГНИТИВНЫЕ ФУНКЦИИ

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

В статье представлены сведения о функциях лептина в организме. Рассматриваются физиологические эффекты лептина в норме и при ожирении. Проводится анализ современных данных о влиянии лептина на сигнальные пути в ядрах гипоталамуса и других отделах мозга. Приводятся сведения о роли лептина в реализации когнитивных функций в норме и при нейродегенеративных заболеваниях, связанных с ожирением.

Ключевые слова: лептин, лептинорезистентность, когнитивные функции, инсулинорезистентность, ожирение, гиппокамп.

Введение. В современном мире увеличивается доля людей, страдающих ожирением и метаболическим синдромом. Ожирение представляет собой полиэтиологическое заболевание, которое часто приводит к различным осложнениям и сопутствующим заболеваниям. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), количество людей с избыточной массой тела и ожирением продолжает нарастать в течение последних 10 лет. По состоянию на 2022 год избыточную массу тела имели 2,5 миллиарда (43 %) взрослых в возрасте от 18 лет и старше; из них более 890 миллионов (16 %) страдали ожирением. Количество детей младше 5 лет с избыточной массой тела составляло примерно 37 миллионов. Среди детей и подростков в возрасте от 5 до 18 лет 390 миллионов (20 %) имели избыточную массу тела, из них 160 миллионов (8 %) страдали ожирением [1].

Целый ряд хронических заболеваний, таких как сахарный диабет 2 типа, сердечно-сосудистые заболевания, гипертония, артрит и некоторые виды рака могут являться последствиями ожирения [2]. Избыток жировой ткани повышает нагрузку на сердце и приводит к его анатомическим изменениям [3]. Одним из последствий ожирения является метаболический синдром, который обусловлен увеличением массы висцерального жира и снижением чувствительности периферических тканей к инсулину, т.е. инсулинорезистентностью (ИР). Это состояние формирует гиперинсулинемию, нарушения углеводного, липидного и пуринового обмена, а также артериальную гипертензию [4]. Инсулин подавляет липолиз в адипоцитах белой жировой ткани, уменьшая образование свободных жирных кислот (СЖК), а ИР проявляется увеличением поступления СЖК в кровь. Избыток СЖК активизирует процессы глюконеогенеза, приводит к повышенному образованию липопротеидов очень низкой плотности и триглицеридов [4, 5].

Наряду с инсулинорезистентностью развивается и лептинорезистентность (ЛР), что приводит к нарушению передачи сигнала гормона, который в норме регулирует потребление пищи [6].

Лептин – это гормон, который секретируется адипоцитами соразмерно объему жировой ткани и осуществляет передачу сигнала об энергетическом статусе организма в мозг. Кратковременное повышение уровня лептина отмечается после приема пищи, а существенное нарастание его продукции обусловлено значительным приростом жировой массы и, соответственно стабильно повышенным уровнем триглицеридов в крови [7]. Секретия лептина, как и других гормонов, непостоянна: пик активности наблюдается около полудня, а минимальный уровень – около полуночи. Связано это с регулятором циркадных ритмов – мелатонином [8].

Структура молекулы лептина и его физиологические эффекты. Молекула лептина имеет молекулярную массу 16 кДа и состоит из 167 аминокислот, а по своей структуре напоминает цитокины класса I. Структурно относится к группе α -спиральных белков, в которую также входят гормон роста, пролактин, эритропоэтин, а также интерлейкины (IL) 2, 3, 4, 5, 10. Однако гомология первичной последовательности с другими цитокинами отсутствует [9, 10].

Расшифрован аминокислотный состав молекулы лептина и установлено, что фрагмент 22–56 является наиболее активным, значительно снижая потребление пищи, фрагмент 116–167 снижает аппетит в меньшей степени, а пептид 57–92 не оказывает влияния на аппетит [11].

Известно, что лептин вырабатывается преимущественно в белой жировой ткани [12, 13]. Небольшие количества лептина синтезируется также в бурой жировой ткани и в других органах и тканях, включая мозг, желудок, скелетные мышцы, молочные железы, плаценту и яичники [14].

В составе молекулы лептина разных животных присутствуют сходные аминокислотные последовательности. Человеческий лептин разделяет 84 % гомологии с мышинным и 83 % с крысиным лептином [9].

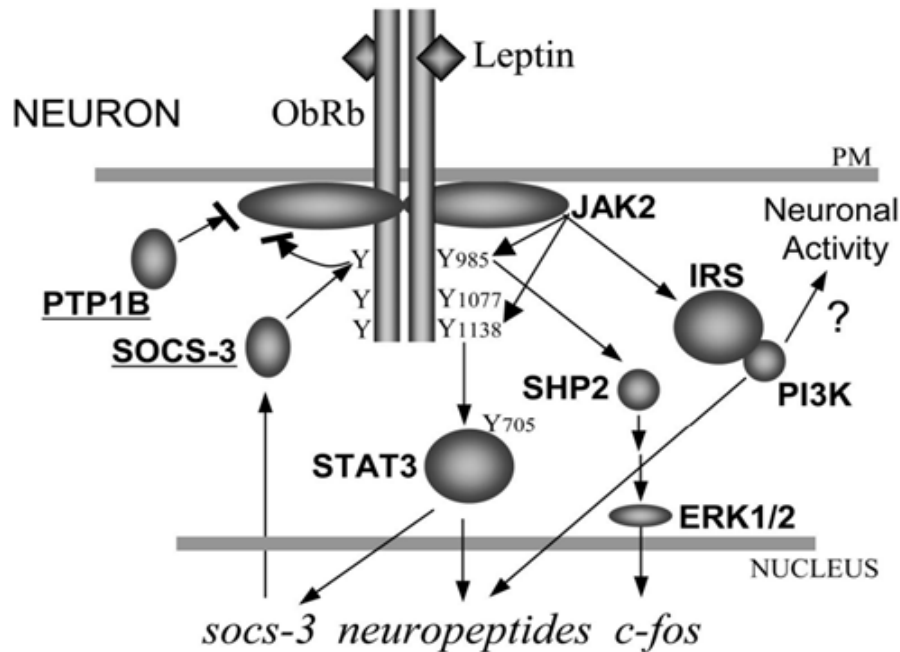
Лептин транспортируется в крови в свободном или связанном с белками плазмы состоянии. У людей с минимальным количеством жировой ткани большая часть лептина циркулирует в связанной с белками крови форме, тогда как у пациентов с ожирением основная часть лептина циркулирует в свободном виде. Общая концентрация лептина в плазме варьирует от 5 нг/мл при нормальной массе тела до 25–100 нг/мл при ожирении [12]. Гормон имеет короткий период полураспада – 25 мин. Основным местом метаболизма лептина являются почки, на долю которых приходится более 80 % всего клиренса из плазмы [15, 16].

Лептин действует системно во всем организме, влияя на метаболические процессы через свои специфические клеточные рецепторы. Рецептор лептина (LEPR) экспрессируется в центральной нервной системе, а также в большинстве периферических тканей, включая кроветворную и иммунную системы. По своей структуре относится к семейству цитокиновых рецепторов I класса. Рецептор лептина существует в нескольких изоформах, которые образуются в результате альтернативного сплайсинга гена LEPR. Эти изоформы отличаются длиной внутриклеточного домена и, следовательно, сигнальными возможностями. Известные изоформы: LEPRa, b, c, d f и e. Из них LEPRb наиболее функционально значимая изоформа, она содержит полный внутриклеточный домен с мотивами, необходимыми для активации сигнальных путей (JAK-STAT, MAPK, PI3K). LEPRb основной медиатор эффектов лептина в гипоталамусе. LEPRa имеет укороченный внутриклеточный домен и участвует в транспорте лептина через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). LEPRc, d и f так же имеют укороченные внутриклеточные домены. Предполагается, что они играют роль в связывании и депонировании лептина, а также участвуют в модуляции активности LEPRb. LEPRе является растворимой изоформой, не имеющей трансмембранного и внутриклеточного доменов [17–19]. Связываясь с циркулирующим лептином и действуя как буфер, изоформа LEPRе играет важную роль в регуляции уровня лептина в кровотоке [20, 21].

Эти структурные особенности лептина и его рецептора обеспечивают многогранное действие лептина, как гормона и адипоцитокина [22]. Выполняя функции гормона, лептин служит важным регулятором потребления пищи и участвует в регуляции обмена веществ. В качестве адипоцитокина лептин усиливает пролиферацию Th1-клеток и выработку провоспалительных цитокинов (IFN- γ , TNF- α), подавляет активность регуляторных Т-клеток [23].

Основные сигнальные пути лептина в нейронах гипоталамуса. Путь Jak/STAT является основным внутриклеточным сигнальным каскадом лептина, связанным с LEPRb (ObRb) (рисунок 1).

Однако LEPRb и, в меньшей степени, LRPRa (ObRa) могут также активировать альтернативные пути, такие как пути PI3K и MAPK [24–26].



JAK2 – янус-киназа-2, PTP1B – протеин-тирозинфосфатаза 1B, SOCS-3 – супрессор цитокиновой сигнализации 3, STAT3 – передатчик сигнала и активатор транскрипции 3, SHP2 – тирозиновая фосфатаза, IRS – субстрат инсулинового рецептора, PI3K – фосфатидил-инозитол-3-киназа, ERK1/2 – внеклеточные сигнальные киназы, *c-fos* – фактор транскрипции, Y – клеточные субстраты [24, 19]

Рисунок 1. Сигнальный каскад лептина

После связывания лептина с LEPRb происходит димеризация рецептора и активация JAK2, которая фосфорилирует тирозиновые остатки в цитоплазматическом домене рецептора. Фосфорилированный LEPRb рекрутирует STAT3. STAT3 фосфорилируется JAK2, димеризуется и перемещается в ядро, где регулирует экспрессию генов, повышая образование POMC (подавляет аппетит) и снижая выработку NPY/AgRP (стимулируют аппетит).

PI3K путь активируется через IRS, что приводит к фосфорилированию АКТ и модуляции активности нейронов.

LEPRb-опосредованная сигнализация регулируется активацией SOCS3 и PTP1B по принципу отрицательной обратной связи [27].

Регуляторные эффекты лептина в ядрах гипоталамуса. Гипоталамус является важнейшей областью мозга, которая получает информацию об энергетическом состоянии организма и трансформирует эти сигналы в реакции нейроэндокринной системы, направленные на регуляцию потребления пищи и энергетических затрат в организме.

Рецепторы лептина в структурах мозга были изучены с использованием молекулярных методов. С помощью анализа гибридизации *in situ* было продемонстрировано наличие мРНК LEPRb в различных структурах мозга, при этом с высокими концентрациями в ядрах гипоталамуса, таких как дугообразное ядро (ARC), паравентрикулярное ядро (PVN), дорсомедиальное гипоталамическое ядро (DMH), вентромедиальное гипоталамическое ядро (VMH) и латеральная гипоталамическая область (LH) [28].

Установлено, что инъекции лептина в дорсомедиальное гипоталамическое ядро у грызунов повышают температуру тела, частоту сердечных сокращений и артериальное давление [29, 30]. Аналогичные эффекты наблюдались также у тучных мышей, устойчивых к анорексигенным эффектам лептина [31]. Активация нейронов дорсомедиального гипоталамического ядра стимулирует термогенез в бурой жировой ткани, расход энергии и повышает температуру тела, при этом не оказывая влияния на потребление пищи. Эти эффекты впоследствии приводят к снижению массы тела [30].

Эффекты инфузии лептина в VMH указывают на то, что чувствительные к лептину нейроны в VMH могут увеличивать активность симпатических нервов, которые регулируют секрецию катехоламинов [29, 32]. На основе этих экспериментов было установлено, что VMH является важнейшей зоной воздействия лептина на симпатическую нервную систему [33].

Ряд работ был посвящен изучению роли нейронов VMH, экспрессирующих стероидогенный фактор 1 (SF1-нейроны), в регуляции термогенеза. Эти нейроны также экспрессируют рецепторы лептина. Мыши с пониженной экспрессией рецепторов лептина на SF1-нейронах демонстрируют склонность к ожирению без изменений в пищевом поведении, что позволяет предположить, что ожирение у этих мышей объясняется более низкими затратами энергии [34–37].

Установлено, что транскрипционный фактор forkhead protein (FOXO1) путем отрицательной обратной связи регулирует эффекты лептина в нейронах, синтезирующих Агути-родственный пептид (AgRP) [38]. Этот механизм так же оказывает действие на термогенные эффекты лептина в вентромедиальных гипоталамических нейронах SF-1. Более того, у мышей с нокаутом FOXO1 была повышена чувствительность к лептину и повышен расход энергии в условиях диеты с высоким содержанием жиров. Таким образом, блокада FOXO1 в VMH стимулирует термогенез, увеличивая расход энергии. Последнее приводит к появлению устойчивости к диет-индуцированному ожирению у мышей. При введении лептина мышам, у которых отсутствует FOXO1 в нейронах SF-1, они существенно снижают массу тела из-за повышенного расхода энергии [39]. В совокупности эти исследования показывают, что лептиновая сигнализация в зоне VMH защищает от развития диет-индуцированного ожирения.

Важную роль в регуляции энергетического обмена играет паравентрикулярное ядро (PVH) гипоталамуса. Нарушение функции PVH приводит к снижению расхода энергии [40]. Лептин в PVH активирует нейроны, ответственные за синтез окситоцина и тиреотропин-рилизинг-гормона, которые регулируют энергетический обмен в организме.

Дугообразное ядро гипоталамуса (ARC) наиболее тесно связано с эффектами лептина, затрагивающими энергетический обмен. Важным фактором является то, что ARC примыкает к срединному возвышению, которое не имеет гематоэнцефалического барьера.

В дугообразном ядре выделяются две ключевые субпопуляции нейронов, регулирующих энергетический баланс: нейроны, экспрессирующие проопиомеланокортин (POMC-нейроны), и нейроны, которые одновременно экспрессируют нейропептид Y (NPY) и агути-родственный пептид (NPY/AgRP-нейроны).

Известно, что лептин неоднозначно влияет на активность нейронов POMC и NPY/AgRP. Например, лептин увеличивает уровни мРНК POMC, одновременно снижая мРНК NPY/AgRP. Помимо регуляции транскрипции, лептин активирует нейроны POMC, одновременно инактивируя нейроны NPY/AgRP [41].

Следует отметить, что проопиомеланокортин предшественник нескольких важных биологически активных пептидов: α -, β -, γ -меланоцитстимулирующего гормона (MSH), адренотропного гормона (АКТГ) и β -эндорфина. Классическая активация нейронов POMC приводит к образованию и высвобождению α -меланоцитстимулирующего гормона (α -MSH), который связывается с нейронами, экспрессирующими рецепторы меланокортина 3 и 4 (MC3/4R). Это приводит к уменьшению потребления пищи и модулирует пути автономной нервной системы, контролирующие термогенез в жировой ткани и расход энергии [42]. Активность этих нейронов модулируется и многочисленными периферическими гормональными сигналами, включая инсулин, глюкокортикоиды и гормоны щитовидной железы [43]. AgRP-нейроны в свою очередь ингибируют POMC-нейроны, а также нисходящие пути меланокортина, что, увеличивает потребление пищи и снижает расход энергии.

Нейропептид Y является стимулятором голода, а AgRP-нейроны блокируют MC4R, являясь антагонистом α -MSH. Действуя на AgRP/NPY-нейроны лептин, подавляет их активность и таким образом снижает чувство голода.

В дополнение к нейропептидам нейроны POMC могут высвобождать аминокислотные трансмиттеры глутамат и γ -аминомасляную кислоту (ГАМК) для быстрой передачи сигнала [44]. У грызунов имеются функционально различные подгруппы глутаматергических и ГАМК-ергических нейронов POMC, небольшой процент из них одновременно выделяет оба нейротрансмиттера. Эти субпопуляции имеют четкую локализацию в ARC, получают отдельные гормональные и нейронные входы и отправляют исходящие сигналы в разные регионы мозга [45].

Известно, что ожирение нарушает нормальное функционирование нейронных сетей ARC, контролирующих энергетический баланс. Длительное применение диеты с высоким содержанием жиров вызывает у мышей фенотип ожирения, связанный со снижением активности POMC-нейронов и резистентностью к лептину. В свою очередь AgRP/NPY-нейроны находятся в состоянии повышенной активности, это приводит к сильному чувству голода [41].

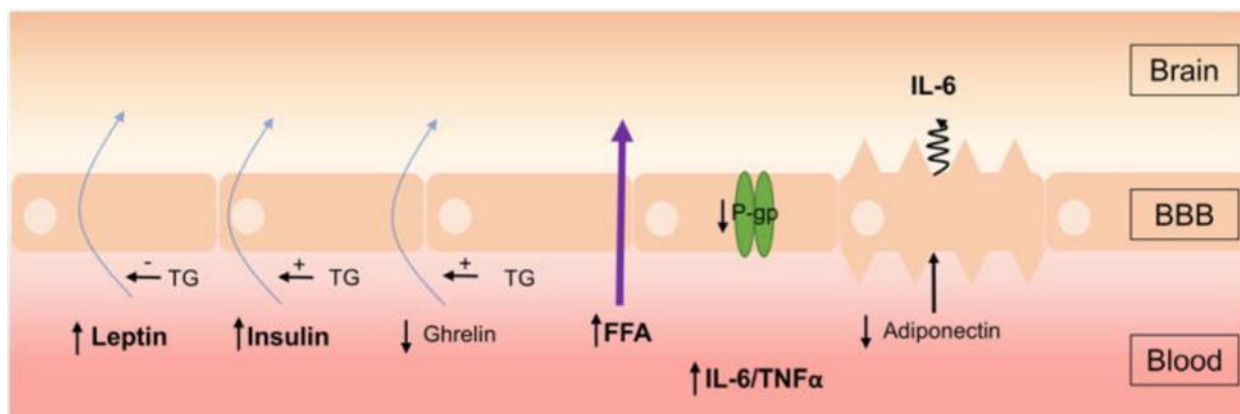
Сниженная активность нейронов POMC при ожирении объясняется многочисленными факторами, включая воспаление, образование активных форм кислорода, стресс эндоплазматического ретикулума [46] и уменьшение аутофагии в нейронах гипоталамуса [47]. Ожирение также связано с пониженной активностью бурой жировой ткани и ослаблением метаболических реакций организма на лептин [31, 43, 48].

Когнитивные функции при ожирении. При ожирении когнитивные функции страдают из-за метаболических, воспалительных и сосудистых нарушений в ткани мозга. Развивается снижение барьерной функции ГЭБ, что способствует проникновению в мозг периферических провоспалительных цитокинов, которые инициируют хроническое нейровоспаление. Воспаление ускоряет апоптоз нервных клеток, особенно в гиппокампе и префронтальной коре [49].

Высококалорийная диета (ВКД) вызывает понижение экспрессии белков в ГЭБ, обеспечивающих его целостность и функциональность. В первую очередь, это белки плотных контактов (окклюдин, клаудины, ZO-1) и транспортные белки (Р-гликопротеин и глюкозный транспортер GLUT1). Также снижается экспрессия белков адгезии (JAM-1) и нейропротективных факторов (SIRT1). Механизмами, обуславливающими подавление экспрессии вышеперечисленных белков, являются воспаление, окислительный стресс и гипергликемия. Как следствие развивается повышенная проницаемость ГЭБ для провоспалительных молекул, бактериальных токсинов и жирных кислот, а также накопление β -амилоида и повышение риска развития болезни Альцгеймера [50].

Для лептина проникновение через ГЭБ является ключевым этапом реализации его метаболических эффектов. В норме транспорт лептина является насыщаемым и регулируемым процессом. После связывания со своим рецептором на эндотелиальных клетках ГЭБ лептин подвергается транцитозу и попадает в интерстициальную жидкость мозга, где может взаимодействовать с нейронами гипоталамуса [51].

При ожирении ГЭБ подвергается воздействию повышенных концентраций лептина, инсулина и свободных жирных кислот (рисунок 2), тогда как уровни грелина и адипонектина снижаются. Транспорт лептина, инсулина и грелина из крови в мозг снижается, а транспорт свободных жирных кислот увеличивается.



(FFA – свободные жирные кислоты, TNF α – фактор некроза опухоли α , IL-6 – интерлейкин 6, TG – триглицериды, BBB – ГЭБ, P-gp – Р-гликопротеин) [52]

Рисунок 2. Транспорт веществ через гематоэнцефалический барьер при ожирении

Показано, что ожирение и хроническая ВКД связаны со снижением когнитивных функций как у людей, так и у животных [53, 54, 49]. Нейронные популяции в гиппокампе имеют особенно высокие метаболические потребности, что делает их уязвимыми для различных внешних (гипоксия, действие токсинов) и внутренних (воспаление, старение) факторов. Несколько исследований на крысах среднего возраста показали, что ВКД ухудшает зависимые от гиппокампа процессы памяти, которые включают обучение и ориентацию в пространстве [55, 56]. Потребление ВКД, вызывая нарушения целостности ГЭБ, влияет на когнитивные функции [57].

Мыши с мутациями в генах лептина (ob/ob) или его рецептора (db/db) демонстрируют нарушенную пластичность гиппокампа, включая измененную долговременную потенцию или долговременную депрессию синаптической силы, что коррелирует с нарушениями в пространственном обучении и дефицитом памяти [58]. На мышах с моделью диет-индуцированного ожирения, было установлено, что нарушенная лептиновая сигнализация в гиппокампе ухудшает пространственное обучение и память, а также метаболизм глутамата [59, 60].

У животных с резистентностью к лептину наблюдаются поведенческие отклонения, связанные с нарушением функциональной активности гиппокампа [61, 62]. Например, грызуны с лептинорезистентностью демонстрируют дефекты пространственного обучения и памяти при выполнении задач в лабиринте Морриса, несмотря на нормальную двигательную активность [63].

Важно отметить, что нарушения лептиновой сигнализации и связанное с ними снижение когнитивных функций, наблюдаемые в моделях ожирения на мышах, согласуются с клиническими данными, полученными у людей с ожирением [64, 65].

Резистентность к лептину в гиппокампе и других областях мозга нарушает исполнительные функции, включая принятие решений, контроль и регуляцию внимания, которые жизненно важны для поддержания осознанного пищевого поведения [66, 67]. Эти нарушения становятся еще более выраженными при нейродегенеративных заболеваниях, таких как болезнь Альцгеймера [68, 69].

Резистентность к лептину при ожирении и нарушения его сигнальных путей при болезни Альцгеймера приводят к когнитивному дефициту, затрагивающему память и исполнительные функции [68–70]. Существенная связь лептинорезистентности с патогенезом болезни Альцгеймера позволяет акцентировать внимание на необходимости восстановления центральных эффектов лептина. Поиск путей доставки лептина в мозг может рассматриваться как терапевтическая стратегия для уменьшения когнитивного дефицита и решения метаболических проблем при нейродегенеративных заболеваниях [68–70]. Это

может быть подходом для предотвращения или даже обращения вспять атрофии гиппокампа и снижения когнитивных функций у пациентов с лептинорезистентностью.

За последние годы накапливаются экспериментальные данные, свидетельствующие о терапевтических возможностях интраназально вводимого лептина. В частности, показано, что интраназально вводимый лептин нормализует метаболические последствия ожирения [71–73] и представляет собой перспективный путь фармацевтического воздействия при метаболическом синдроме и связанных с ним заболеваниях, включая сферу когнитивных нарушений.

Заключение. Ожирение – это хроническое заболевание, характеризующееся патологическим накоплением жировой ткани, приводящим к системному воспалению, метаболическим нарушениям и органной дисфункции.

Гипертрофия и гиперплазия адипоцитов при ожирении приводит к дисрегуляции секреции адипокинов (лептин, адипонектин и др.), лептинорезистентности и, как следствие, к нарушению контроля аппетита, термогенеза и энергетического баланса в организме (гипоталамическая дисфункция).

Лептинорезистентность нарушает нормальную функцию гиппокампа и, снижая синаптическую пластичность, приводит к когнитивным отклонениям.

Устранение резистентности к лептину является терапевтической стратегией нормализации метаболизма и дисфункции гиппокампа при ожирении.

Благодарность. Выражаю благодарность своему научному руководителю кандидату биологических наук, доценту Митюковой Татьяне Алексеевне за ценные советы и рекомендации по написанию статьи.

Литература:

- [1]. Всемирная организация здравоохранения [сайт]. – URL: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> (дата доступа 03.01.2025).
- [2]. *Piché M.E., Tchernof A., Després J.P.* Obesity Phenotypes, Diabetes, and cardiovascular diseases // *Circulation research*. 2020. Vol. 126. № 11. P. 1477–1500.
- [3]. *Conway B., Rene A.* Obesity as a disease: no lightweight matter // *Obesity reviews*. 2004. Vol. 5. № 3. P. 145–151.
- [4]. *Fahed G., Aoun L., Zerdan M.B. et al.* Metabolic syndrome: updates on pathophysiology and management in 2021 // *International journal of molecular sciences*. 2022. Vol. 23. № 2. P. 786.
- [5]. *Boden G.* Obesity and free fatty acids // *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2008. Vol. 37. № 3. P. 635–646.
- [6]. *Peng J., Yin L., Wang X.* Central and peripheral leptin resistance in obesity and improvements of exercise // *Hormones and behavior*. 2021. Vol. 133. P. 1–11.
- [7]. *Banks W.A., Coon A.B., Robinson S.M. et al.* Triglycerides induce leptin resistance at the blood–brain barrier // *Diabetes*. 2004. Vol. 53. № 5. P. 1253–1260.
- [8]. *Kus I., Sarsilmaz M., Colakoglu N. et al.* Pinealectomy increases and exogenous melatonin decreases leptin production in rat anterior pituitary cells: an immunohistochemical study // *Physiol Res*. 2004. Vol. 53. № 4. P. 403–408.
- [9]. *Madej T., Boguski M.S., Bryant S.H.* Threading analysis suggests that the obese gene product may be a helical cytokine // *FEBS Lett*. 1995. Vol. 373. P. 13–18.
- [10]. *Zhang F., Chen Y., Heiman M. et al.* Leptin: structure, function and biology // *Vitam Horm*. 2005. Vol. 71. P. 345–372.
- [11]. *Терещенко И.В.* Лептин и его роль в организме // *Проблемы Эндокринологии*. 2001. Т. 476 № 4. С. 40–46.
- [12]. *Friedman J.M.* Leptin and the endocrine control of energy balance // *Nat. Metab*. 2019. Vol. 1. P. 754–764.
- [13]. *Coccurello R., Maccarrone M.* Hedonic Eating and the “Delicious Circle”: From Lipid-Derived Mediators to Brain Dopamine and Back // *Front. Neurosci*. 2018. Vol. 12. P. 1–20.
- [14]. *Park H.K., Ahima R.S.* Physiology of leptin: Energy homeostasis, neuroendocrine function and metabolism // *Metabolism*. 2015. Vol. 64. P. 24–34.
- [15]. *Cumin F., Baum H.P., Levens N.* Leptin is cleared from the circulation primarily by the kidney // *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord*. 1996. Vol. 20. P. 1120–1126.

- [16]. Ceccarini G., Flavell R.R., Butelman E.R., et al. PET imaging of leptin biodistribution and metabolism in rodents and primates // *Cell Metab.* 2009. Vol. 10. № 2. P. 148–159.
- [17]. Gorska E., Popko K., Stelmaszczyk-Emmel A. et al. Leptin receptors // *Eur. J. Med. Res.* 2010. Vol. 15. P. 50–54.
- [18]. Obradovic M., Sudar-Milovanovic E., Soskic S. et al. Leptin and Obesity: Role and Clinical Implication. *Front // Endocrinol.* 2021. Vol. 12. P. 1–14.
- [19]. Zewdu J.T., Tesfaye G.L. The Effect of Leptin on the Hypothalamic-Pituitary Gonadal Axis and Puberty // *International Journal of Health Sciences and Research.* 2017. Vol. 7. № 5. P. 332–344.
- [20]. Lammert A., Kiess W., Bottner A. et al. Soluble leptin receptor represents the main leptin binding activity in human blood // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001. Vol. 283. № 4. P. 982–988.
- [21]. Chan J.L., Blüher S., Yiannakouris N. et al. Regulation of circulating soluble leptin receptor levels by gender, adiposity, sex steroids, and leptin: Observational and interventional studies in humans. // *Diabetes.* 2002. Vol. 51. № 7. P. 2105–2112.
- [22]. Маркова Т.Н., Мищенко Н.К., Петина Д.В. Адипоцитокнины: современный взгляд на дефиницию, классификацию и роль в организме // *Проблемы эндокринологии.* 2021. Т. 68. № 1. С. 73–80.
- [23]. Matarese G., Moschos S., Mantzoros C.S. Leptin in immunology // *J Immunol.* 2005. Vol. 174. № 6. P. 3137–3142.
- [24]. Bjørbaek C., Kahn B.B. Leptin signaling in the central nervous system and the periphery // *Recent Prog. Horm. Res.* 2004. Vol. 59. P. 305–331.
- [25]. Frühbeck G. Intracellular signalling pathways activated by leptin // *Biochem. J.* 2006. Vol. 393. № 1. P. 7–20.
- [26]. Saxton R.A., Caveney N.A., Moya-Garzon M.D. et al. Structural insights into the mechanism of leptin receptor activation // *Nat. Commun.* 2023. Vol. 14. P. 1–10.
- [27]. Cui H, López M, Rahmouni K. The cellular and molecular bases of leptin and ghrelin resistance in obesity // *Nat Rev Endocrinol.* 2017. Vol. 13. № 6. P. 338–351.
- [28]. Swieten van M.M.H., Pandit R., Adan R.A.H. The neuroanatomical function of leptin in the hypothalamus // *Journal of Chemical Neuroanatomy.* 2014. Vol. 61–62. P. 207–220.
- [29]. Marsh A.J., Fontes M.A., Killinger S. Cardiovascular responses evoked by leptin acting on neurons in the ventromedial and dorsomedial hypothalamus // *Hypertension.* 2003. Vol. 42. P. 488–493.
- [30]. Rezai-Zadeh K., Yu S., Jiang Y. et al. Leptin receptor neurons in the dorsomedial hypothalamus are key regulators of energy expenditure and body weight, but not food intake // *Mol Metab.* 2014. Vol. 3. P. 681–693.
- [31]. Enriori P.J., Sinnayah P., Simonds S.E. et al. Leptin action in the dorsomedial hypothalamus increases sympathetic tone to brown adipose tissue in spite of systemic leptin resistance // *J Neurosci.* 2011. Vol. 31. № 34. P. 12189–12197.
- [32]. Montanaro M.S., Allen A.M., Oldfield B.J. Structural and functional evidence supporting a role for leptin in central neural pathways influencing blood pressure in rats // *Exp Physiol.* 2005. Vol. 90. P. 689–696.
- [33]. Minokoshi Y., Haque M.S., Shimazu T. Microinjection of leptin into the ventromedial hypothalamus increases glucose uptake in peripheral tissues in rats // *Diabetes.* 1999. Vol. 48. P. 287–291.
- [34]. Dhillon H., Zigman J.M., Ye C. et al. Leptin directly activates SF1 neurons in the VMH, and this action by leptin is required for normal body-weight homeostasis // *Neuron.* 2006. Vol. 49. P. 191–203.
- [35]. Bingham N. C., Anderson K.K, Reuter L.A. et al. Selective loss of leptin receptors in the ventromedial hypothalamic nucleus results in increased adiposity and a metabolic syndrome // *Endocrinology.* 2008. Vol. 149. № 5. P. 2138–2148.
- [36]. Tong Q., Ye C., McCrimmon R.J., Dhillon H. et al. Synaptic glutamate release by ventromedial hypothalamic neurons is part of the neurocircuitry that prevents hypoglycemia // *Cell Metab.* 2007. Vol. 5. № 5. P. 383–393.
- [37]. Cardinal P., André C., Quarta C. et al. CB1 cannabinoid receptor in SF1-expressing neurons of the ventromedial hypothalamus determines metabolic responses to diet and leptin // *Mol Metab.* 2014. Vol. 13. № 7. P. 705–716.
- [38]. Kitamura T., Feng Y., Kitamura Y.I. et al. Forkhead protein FoxO1 mediates Agrp-dependent effects of leptin on food intake // *Nat Med.* 2006. Vol. 12. P. 534–540.
- [39]. Kim K.W., Donato J.Jr., Berglund E.D. et al. FOXO1 in the ventromedial hypothalamus regulates energy balance // *J Clin Invest.* 2012. Vol. 122. № 7. P. 2578–2589.
- [40]. De Luca B., Monda M., Amaro S. et al. Lack of diet-induced thermogenesis following lesions of paraventricular nucleus in rats // *PhysiolBehav.* 1989. Vol. 46. № 4. P. 685–691.
- [41]. Cowley M.A., Smart J.L., Rubinstein M. et al. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus // *Nature.* 2001. Vol. 411. P. 480–484.

- [42]. Cai M., Hruby V.J. The Melanocortin Receptor System: A Target for Multiple Degenerative Diseases // *Curr. Protein Pept. Sci.* 2016. Vol. 17. P. 488–496.
- [43]. Vargas-Castillo A., Fuentes-Romero R., Rodriguez-Lopez L.A. et al. Understanding the Biology of Thermogenic Fat: Is Browning a New Approach to the Treatment of Obesity? // *Arch. Med. Res.* 2017. Vol. 48. P. 401–413.
- [44]. Mercer A.J., Hentges S.T., Meshul C.K. et al. Unraveling the Central Proopiomelanocortin Neural Circuits // *Front. Neurosci.* 2013. Vol. 7. P. 1–12.
- [45]. Wittmann G., Hrabovszky E., Lechan R.M. Distinct Glutamatergic and GABAergic Subsets of Hypothalamic Pro-Opiomelanocortin Neurons Revealed by in Situ Hybridization in Male Rats and Mice // *J. Comp. Neurol.* 2013. Vol. 521. № 14. P. 3287–3302.
- [46]. Дедов И.И., Смирнова О.М., Горельшев А.С. Стресс эндоплазматического ретикулума: цитологический сценарий патогенеза заболеваний человека // *Проблемы эндокринологии.* 2012. Т. 58. № 5. С. 57–65.
- [47]. Toda C., Santoro A., Kim J.D. et al. POMC Neurons: From Birth to Death // *Annu Rev Physiol.* 2017. Vol. 79. P. 209–236.
- [48]. Kanoski S.E., Zhang Y., Zheng W. et al. The effects of a high-energy diet on hippocampal function and blood-brain barrier integrity in the rat // *J Alzheimers Dis.* 2010. Vol. 21. №1. P. 207–219.
- [49]. Moraes J.C., Coope A., Morari J. et al. High-fat diet induces apoptosis of hypothalamic neurons // *PLoS One.* 2009. Vol. 4. № 4.
- [50]. Feng Z., Fang C., Ma Y. et al. Obesity-induced blood-brain barrier dysfunction: phenotypes and mechanisms // *J Neuroinflammation.* 2024. Vol. 21. № 1. P. 1–22.
- [51]. Бородкина Д.А., Груздева О.В., Акбашева О.Е. и др. Лептинорезистентность, нерешенные вопросы диагностики // *Проблемы эндокринологии.* 2018. Т. 64. № 1. С. 62–66.
- [52]. Rhea E.M., Salameh T.S., Logsdon A.F. et al. Blood-Brain Barriers in Obesity // *AAPS J.* 2017. Vol. 19. № 4. P. 921–930.
- [53]. Prickett C, Brennan L, Stolwyk R. Examining the relationship between obesity and cognitive function: a systematic literature review // *Obesity Research & Clinical Practice.* 2015. Vol. 9, № 2. P. 93–113.
- [54]. Walker J.M., Dixit S., Saulsberry A.C. et al. Reversal of high fat diet-induced obesity improves glucose tolerance, inflammatory response, beta-amyloid accumulation and cognitive decline in the APP/PSEN1 mouse model of Alzheimer's disease. // *Neurobiol Dis.* 2017. Vol. 100. P. 87–98.
- [55]. Granholm A-C, Bimonte-Nelson H.A., Moore A.B. et al. Effects of a saturated fat and high cholesterol diet on memory and hippocampal morphology in the middle-aged rat // *Journal of Alzheimer's disease.* 2008. Vol. 14. № 2. P. 133–145.
- [56]. Stranahan A.M., Norman E.D., Lee K. et al. Diet-induced insulin resistance impairs hippocampal synaptic plasticity and cognition in middle-aged rats // *Hippocampus.* 2008. Vol. 18. № 11. P. 1085–1092.
- [57]. Persidsky Y., Ramirez S.H., Haorah J. et al. Blood–brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions // *J Neuro Immune Pharmacol.* 2006. Vol. 1. № 3. P. 223–236.
- [58]. Watanabe T.; Sakamoto K. Meta-analysis of cognitive and behavioral tests in leptin- and leptin receptor-deficient mice // *Neurosci. Res.* 2021. Vol. 170. P. 217–235.
- [59]. Valladolid-Acebes I., Merino B., Principato A. et al. High-fat diets induce changes in hippocampal glutamate metabolism and neurotransmission // *Am. J. Physiol. Endocrinol.* 2012. Vol. 302. P. 396–402.
- [60]. Kuhn H.G., Skau S., Nyberg J. A lifetime perspective on risk factors for cognitive decline with a special focus on early events // *Cereb Circ Cogn Behav.* 2024. Vol. 6. P. 1–9.
- [61]. Kamal A., Ramakers G.M., Gispen W.H. et al. Hyperinsulinemia in rats causes impairment of spatial memory and learning with defects in hippocampal synaptic plasticity by involvement of postsynaptic mechanisms // *Exp Brain Res.* 2013. Vol. 226, № 1. P. 45–51.
- [62]. Valladolid-Acebes I., Fole A., Martín. M. et al. Spatial memory impairment and changes in hippocampal morphology are triggered by high-fat diets in adolescent mice. Is there a role of leptin? // *Neurobiol Learn Mem.* 2013. Vol. 106. P. 18–25.
- [63]. Sharma A.N., Elased K.M., Garrett T.L. et al. Neurobehavioral deficits in db/db diabetic mice // *Physiol Behav.* 2010. Vol. 101. № 3. P. 381–388.
- [64]. Mou Y., Blok E., Barroso M. et al. Dietary patterns, brain morphology and cognitive performance in children: Results from a prospective population-based study // *Eur. J. Epidemiol.* 2023. Vol. 38. № 6. P. 669–687.
- [65]. Cao G.Y., Li M., Han L. et al. Dietary Fat Intake and Cognitive Function among Older Populations: A Systematic Review and Meta-Analysis // *J. Prev. Alzheimer's Dis.* 2019. Vol. 6. P. 204–211.

- [66]. Eichen D.M., Kang Sim D.E., Appleton-Knapp S.L. et al. Adults with overweight or obesity use less efficient memory strategies compared to adults with healthy weight on a verbal list learning task modified with food words // *Appetite*. 2023. Vol. 181. P. 1–16.
- [67]. Higgs S., Spetter M.S., Thomas J.M. et al. Interactions between metabolic, reward and cognitive processes in appetite control: Implications for novel weight management therapies // *J. Psychopharmacol.* 2017. Vol. 31. № 11. P. 1460–1474.
- [68]. Kommaddi R.P., Gowaikar R., Haseena P.A. et al. Akt activation ameliorates deficits in hippocampal-dependent memory and activity-dependent synaptic protein synthesis in an Alzheimer's disease mouse model // *J. Biol. Chem.* 2024. 300. № 2. P. 1–15.
- [69]. Flores-Cordero J.A., Pérez-Pérez A., Jiménez-Cortegana C. et al. Obesity as a Risk Factor for Dementia and Alzheimer's Disease: The Role of Leptin // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. Vol. 23. № 9. P. 1–22.
- [70]. Maioli S., Lodeiro M., Merino-Serrais P. et al. Alterations in brain leptin signalling in spite of unchanged CSF leptin levels in Alzheimer's disease // *Aging Cell*. 2015. Vol. 14. № 1. 122–129.
- [71]. Schulz C., Paulus K., Jöhren O. et al. Intranasal leptin reduces appetite and induces weight loss in rats with diet-induced obesity (DIO) // *Endocrinology*. 2012. Vol. 153. № 1. P. 143–153.
- [72]. Бахтюков А.А., Лебедев И.А., Кузнецова В.С. и др. Модулирующий эффект фрагмента лептина 116–122 на тестикулярный стероидогенез у самцов крыс // *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2023. Т. № 109. № 5. С. 689–700.
- [73]. Yuan D., Yi X., Zhao Y. et al. Intranasal delivery of N-terminal modified leptin-pluronic conjugate for treatment of obesity // *J. Control Release*. 2017. Vol. 10. № 263. P. 172–184.

A. E. BARTOSH

PHYSIOLOGICAL ROLE OF LEPTIN IN NORMAL STATES AND IN OBESITY: INFLUENCE ON COGNITIVE FUNCTIONS

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

Summary

The article provides information about the role of leptin in the body. The physiological effects of leptin in normal conditions and in leptin resistance developing against the background of diet-induced obesity are considered. An analysis of modern data on the signaling pathways of leptin influence in the hypothalamic nuclei and other parts of the brain is conducted. Information is provided on the role of leptin in the implementation of cognitive functions and the development of neurodegenerative diseases associated with obesity.

Keywords: leptin, leptin resistance, cognitive functions, insulin resistance, obesity, hippocampus.

С. А. КОЛЫХАН, Т. Б. МЕЛИК-КАСУМОВ

РОЛЬ ИММУННЫХ ПРОЦЕССОВ В РЕАЛИЗАЦИИ КИШЕЧНО-МОЗГОВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ПРИ ЭПИЛЕПТОГЕНЕЗЕ

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

В статье рассматриваются современные научные сведения о роли микробиоты в развитии эпилепсии (эпилептогенезе) с точки зрения иммунных процессов. Представлены основные положения концепции оси «кишечник-мозг», данные о влиянии кишечной микробиоты на работу иммунитета и нейровоспаление, а также о роли кишечного и гематоэнцефалического барьеров в реализации кишечно-мозговых взаимодействий при эпилепсии. Приведены сведения об изменении состава кишечной микробиоты у пациентов с эпилепсией, а также результаты экспериментальных и клинических исследований эффективности методов нормализации кишечной микробиоты.

Ключевые слова: кишечная микробиота, ось «кишечник-мозг», иммунитет, нейровоспаление, эпилепсия.

Введение. Микробиота кишечника – это совокупность микроорганизмов, обитающих в кишечнике человека и животных. Триллионы бактерий, которые могут быть как важными участниками в нормальной жизнедеятельности организма, так и способствовать развитию заболеваний, взаимодействуют с огромной площадью кишечника. Дисбаланс микробиоты (дисбиоз) кишечника ассоциирован с многими заболеваниями. Микробиота способна оказывать влияние на работу многих органов, в том числе путём модуляции иммунной системы. Это подтверждается изменениями в составе микробиоты при различных заболеваниях: сахарный диабет 1 типа [1] и 2 типа [2], астма [3], аллергия [4] и т.д. Микробиота способна оказывать влияние на работу многих органов, в том числе путём модуляции иммунной системы. Так, были выделены двунаправленные взаимодействия, или оси: ось «кишечник-печень» [5], ось «кишечник-кость» [6], ось «кишечник-почки» [7], ось «кишечник-легкие» [8], ось «кишечник-сердце» [9] и ось «кишечник-мозг» [10].

Ось «кишечник-мозг». Термин «ось кишечник-мозг» относится к двунаправленным взаимодействиям между желудочно-кишечным трактом и центральной нервной системой (ЦНС). Эти взаимодействия могут реализовываться по нескольким путям, которые включают [11, 12]:

1. выделение в кровь микробных метаболитов, таких как короткоцепочечные жирные кислоты, биогенные амины, индолы, вторичные желчные кислоты, а также компоненты клеток;
2. блуждающий нерв и в меньшей степени симпатические нервы;
3. гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую ось;
4. выделение нейротропных пептидных гормонов энтероэндокринными клетками;
5. выделение медиаторов иммунной системы клетками лимфоидной ткани кишечника.

При этом по современным представлениям в большинстве случаев активация влияния кишечника на работу мозга так или иначе идет за счет метаболитов кишечной микробиоты [11]. Таким образом, ключевым участником кишечно-мозговой оси является микробиота кишечника.

Значительное влияние микробиоты на развитие и работу ЦНС показано в экспериментах [13]. У гнотобионтов – лабораторных животных, с рождения не имеющих кишечной микробиоты, – по сравнению с обычными животными отмечено изменение уровня нейротрансмиттеров как в ЦНС, так и в энтеральной нервной системе [14, 15]. При этом отличия нивелируются после колонизации кишечника гнотобионтов микробиотой обычных животных. Гнотобионы, как правило, демонстрируют сниженную тревожность в обычных

условиях [15, 16]. При этом их реакция на стресс, напротив, обычно более выраженная и связана с более высокими уровнями в крови адренокортикотропного гормона и кортизола [17, 18]. Нормализация реакции на стресс после микробной колонизации кишечника у гнотобионтов зависит от возраста, так как наблюдается только у молодых животных. Это указывает на существование критического периода, в течение которого устанавливаются особенности взаимодействия между микробиотой и организмом хозяина [17].

Стресс, по-видимому, существенным образом влияет на усиление взаимодействия микробиоты с организмом хозяина за счет увеличения проницаемости кишечного барьера и одновременной иммуномодуляции ввиду эффектов кортизола. Так, моделирование стресса у мышей в течение трех дней приводит к увеличению парацеллюлярной проницаемости толстого кишечника, при этом отмечается увеличение экспрессии интерферона-гамма и снижение экспрессии белков плотных контактов ZO-2 и окклюдина [19]. Одновременно с увеличением проницаемости кишечного барьера происходит усиление секреции в клетках Панета антимикробного пептида альфа-дефензина [20], который существенно изменяет состав кишечной микробиоты в долгосрочной перспективе.

Кишечная микробиота и иммунитет. Изменение ввиду различных причин баланса микробиоты в сторону патогенных микроорганизмов непременно вызывает реакцию кишечного иммунитета [21, 22]. В большинстве случаев эти процессы ассоциированы с воспалением кишечника, являясь его причиной, либо следствием. Таким образом, дисбиоз в отдельных случаях может являться как биомаркером, так и триггером к развитию различных заболеваний. Так, в случае воспалительных заболеваний кишечника отмечено развитие дисбиотических изменений в кишечном содержимом: титр *Bifidobacterium longum*, *Eubacterium rectale*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Roseburia intestinalis* и других полезных бактерий падает [23]. С другой стороны, установлено, что длительное применение антибиотиков приводит к устойчивому дисбиозу кишечника, который в свою очередь способствует ослаблению местного иммунитета [24].

Взаимодействие кишечной микробиоты и её метаболитов с клетками лимфоидной ткани является первым звеном в реализации иммунологического пути оси «кишечник-мозг». Кишечник включает в себя крупнейшее скопление лимфоидной ткани в организме. Постоянное взаимодействие микроорганизмов и продуктов их жизнедеятельности со стенками кишечника требует хорошо отлаженных механизмов врожденной и адаптивных иммунных реакций [25]. Важнейшую роль в работе системы лимфоидной ткани кишечника играют лимфоидные клетки врожденного иммунитета (ILC) [26]. К этой группе относятся в том числе естественные киллеры и индукторы лимфоидной ткани. Определение компонентов микроорганизмов такими клетками происходит благодаря рецепторам опознавания паттерна (PRR), среди которых ключевую роль играют мембранные толл-подобные рецепторы (TLR), активирующие универсальный фактор транскрипции NF- κ B [27]. Учитывая связь ILC-клеток с механизмами врожденного иммунитета, они могут также играть важную роль в реализации эффектов кишечной микробиоты на организм хозяина. Активация рецепторов PRR на клетках лимфоидной ткани кишечника приводит к увеличению синтеза и выделения различных цитокинов как паракринно, так и в кровоток. В последнем случае происходит изменение общей иммунореактивности организма [28].

Влияние на работу иммунной системы оказывают не только компоненты клеток микроорганизмов, но и их метаболиты. Наиболее выраженные эффекты показаны для короткоцепочечных жирных кислот (КЖК: пропионовая, масляная, валериановая и их структурные изомеры), которые образуются в результате бактериальной ферментации неперевариваемых полисахаридов [29], а также для производных индола, образующихся при ферментации триптофана [30]. КЖК являются лигандами рецепторов свободных жирных кислот (FFAR2 и FFAR3), которые экспрессируются в том числе на поверхности Т-регуляторных и дендритных клеток [31, 32]. Кроме того, КЖК обладают высоким сродством с рецепторами, активируемыми пероксисомным пролифератором (PPAR α и PPAR γ), которые

являются факторами транскрипции множества генов, ассоциированных с воспалением и обменом веществ [11]. Производные индола, продуцируемые микробиотой, являются лигандами рецептора ароматических углеводородов (AHR), который также относится к транскрипционным факторам [33]. Он регулирует экспрессию генов врожденного иммунитета, в том числе увеличивает экспрессию интерлейкина-22, усиливающего пролиферацию и выживаемость клеток и стимулирующего выработку антимикробных агентов – белка S100 и дефензинов [34]. Выработка антимикробных агентов, вероятно, создает петлю отрицательной обратной связи, что препятствует чрезмерному размножению бактерий-производителей индола и его производных.

Влияние микробиоты на развитие эпилепсии через иммунные процессы.

Взаимодействие кишечника и микробиоты в раннем возрасте приводит к установлению прочных взаимных связей, которые участвуют в обеспечении индивидуального уровня иммунной реактивности, что в том числе подтверждается экспериментами с гнотобионтами [35]. Согласно концепции оси «кишечник-мозг», описанные выше пути модуляции иммунитета микробиотой могут играть важное значение в патогенезе неврологических заболеваний, так как большинство из них ассоциировано с нейровоспалением [36]. Среди неврологических заболеваний в этом контексте особое место занимает эпилепсия, так как в её патогенезе важное значение имеет складывающийся порочный круг «эпилептические приступы – нейродеструкция – нейровоспаление – усиление приступов». Таким образом, нейровоспаление может являться одной из ключевых точек приложения воздействия микробиоты на эпилептогенез за счет модуляции иммунитета [37].

Под нейровоспалением понимают воспалительный процесс в нервной ткани, в процессе которого ключевую роль играют микроглия и астроглия [38, 39]. Астроциты являются наиболее многочисленными глиальными клетками в мозге и имеют множество функций, которые включают разграничение нейронов, регуляцию состава межклеточной жидкости и поддержание глимфатического потока, обеспечение целостности гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), рециркуляцию нейротрансмиттеров и участие в иммунных реакциях [40]. Микроглиальные клетки являются резидентными макрофагами ЦНС, непосредственно обеспечивающими иммунный ответ [41]. В процессе эпилептогенеза микроглия активируется в фенотип крупных амебоидных клеток без отростков. Эта активация приводит к выработке ими провоспалительных цитокинов, фагоцитированию нейронов и синапсов и, как следствие, к дальнейшему усилению судорожной активности [42].

В условиях эпилептогенеза астроглия и микроглия взаимно активируются, выделяя избыточное количество медиаторов иммунного ответа [38]. В частности, в мышинной модели показано что, микроглия может модулировать переход астроцитов в реактивный фенотип посредством VEGF-B, либо, напротив, подавлять их активность за счет выделения TGF- α [43]. Важно отметить, что экспрессия VEGF-B и TGF- α контролируется транскрипционным фактором AHR, лигандом которого, как было сказано выше, являются производные индола, синтезируемые кишечной микробиотой из пищевого триптофана. Таким образом реализуется, по-видимому, один из механизмов иммуномодулирующего влияния микробиоты на нейровоспаление [43, 44]. Провоспалительные цитокины и хемокины, выделяемые астроцитами, в свою очередь усиливают активность микроглии, включая её миграцию, фагоцитоз отдельных синапсов и нейронов, находящихся в состоянии апоптоза и некробиоза [45]. Увеличение продукции провоспалительных цитокинов в результате взаимодействия между астроцитами и микроглией в ходе нейровоспаления приводит к увеличению проницаемости ГЭБ, что способствует инфильтрации иммунных клеток периферической крови и цитокинов в ЦНС и переходу к хроническому нейровоспалению [10]. В таком случае периферические Т-клетки и моноциты, проникающие в мозговую ткань, также участвуют в дальнейшем эпилептогенезе. В частности, моноциты, проникая в мозг, дифференцируются в «микроглиоподобные клетки», усиливая нейровоспаление и способствуя таким образом дальнейшему развитию патогенеза эпилепсии [46].

Важное значение микробиоты для нормального развития нейроглии показано в экспериментах. Так, у гнотобинтов и животных с антибиотик-ассоциированным дисбиозом отмечено изменение морфологии микроглии с дефектами созревания, активации и дифференциации. При этом реколонизация кишечника гнотобинтов «здоровой» микробиотой приводит к постепенному возвращению структуры микроглии мозга к нормальной [47].

Как было описано выше, нарушение проницаемости ГЭБ в условиях эпилепсии является одним из ключевых звеньев её осложнения. Вместе с тем, еще одним фактором усиления эпилептогенеза является одновременное нарушение проницаемости кишечного барьера, так как наряду с ГЭБ кишечный барьер предотвращает попадание компонентов микроорганизмов и их метаболитов в мозг. В частности, показано, что проницаемость ГЭБ увеличивается на протяжении всей жизни мышей-гнотобионтов, что связано со снижением экспрессии белков окклюдина и клаудина-5 в эндотелии капилляров мозга [48]. Вместе с тем, экспериментально показано, что кишечный дисбиоз снижает выработку клаудина и увеличивает проницаемость слизистой оболочки кишечника, что приводит к выходу микроорганизмов, метаболитов и токсинов из просвета кишечника во внутреннюю среду организма. При дисбиозе параллельно снижает уровень КЖК, что также увеличивает проницаемость ГЭБ [49]. Кроме того, известно, что синдром «дырявого кишечника» характеризуется повышенной его проницаемостью, при этом токсичные метаболиты бактерий попадают в кровоток [50]. Эти процессы часто сопряжены с воспалением кишечника и активацией периферических иммунных клеток [51]. Последующее изменение периферического цитокинового профиля влияет на работу компонентов ГЭБ (эндотелиоциты, перициты, астроциты), увеличивая его проницаемость. Кроме того, непосредственная активация на этих клетках TLR-рецепторов бактериальными эндотоксинами также ухудшает их барьерную функцию [52, 53]. Ослабление барьерной функции кишечника и ГЭБ в ходе периферического воспаления способствует усилению нейровоспаления в условиях неврологических заболеваний, в том числе эпилепсии. Это происходит в том числе за счет активации эндотоксинами TLR-рецепторов уже на клетках нейроглии [54]. Связь кишечного воспаления и нарушения кишечного барьера с патогенезом эпилепсии была доказана экспериментально. В частности, восприимчивость к эпилептическим судорогам была выше в пентилентетразоловой модели у крыс с предварительно индуцированным колитом [55]. В другом исследовании показано, что в модели острых индуцированных судорог воспаление толстого кишечника увеличивает судорожную активность и снижает эффективность противоэпилептических препаратов. При этом, специфическое лечение колита оказывает противоэпилептический эффект [56]. Кроме того, у крыс с индуцированной моделью колита в гиппокампе наблюдается развитие признаков нейровоспаления: активация микроглии и увеличение экспрессии фактора некроза опухоли альфа (TNF α) [55]. Результаты подобных исследований указывают на потенциальную связь между развитием воспалительных заболеваний кишечника и патогенезом эпилепсии, причем ключевую роль в этой связи играет микробиота [57].

Клинические данные о составе кишечной микробиоты при эпилепсии. Результаты некоторых исследований выявили существенные изменения в составе и разнообразии микробиоты у пациентов с эпилепсией. В частности, у детей с фармакорезистентной эпилепсией было обнаружено значительное увеличение количества патогенных бактерий и снижение количества полезных бактерий кишечника по сравнению со здоровыми детьми [58, 59]. Уточняя эти результаты, в другом исследовании показано, что у детей с эпилепсией в кишечнике увеличено содержание бактерий родов *Escherichia* и *Shigella* [60]. В другом исследовании были обнаружены отличия в составе микробиоты у пациентов с фармакорезистентной эпилепсией по сравнению со здоровыми людьми и с пациентами, отвечавшими на терапию противосудорожными препаратами. В этом же исследовании была выявлена связь между составом микробиоты и количеством приступов: у пациентов с более чем четырьмя приступами в год титр бифидобактерий и лактобацилл кишечника был ниже,

чем у пациентов с меньшим количеством приступов [61]. В другом исследовании обнаружено, что у пациентов с идиопатической фокальной эпилепсией содержание протеобактерий и фузобактерий в кишечнике было выше, а бактероидов и актинобактерий – ниже, чем у здоровых людей. Авторы обращают внимание, что обилие в кишечнике бактерий первых двух групп часто связывают с развитием некоторых аутоиммунных заболеваний, тогда как две других группы оказывают в целом положительное влияние на иммунную систему [62].

Крупный метаанализ клинических исследований по оценке состава кишечной микробиоты пациентов с тяжелыми формами эпилепсии, проведенный в 2024 году (10 исследований, всего 183 пациента и 283 здоровых добровольца), показал, что у пациентов с эпилепсией в кишечнике титр *Bacteroidetes* и *Ruminococcaceae* значительно ниже, а титр *Proteobacteria* и *Verrucomicrobia* – значительно выше, чем у здоровых людей. При этом было выявлено, что выраженность этих изменений положительно коррелирует с частотой возникновения судорог [63]. Систематический обзор клинических исследований, включающих случаи эпилепсии различной степени тяжести (16 исследований, всего 438 пациента и 369 здоровых добровольца) и проведенный в 2024 году, также указывает на существенную связь эпилептогенеза и изменений в составе кишечной микробиоты. Несмотря на отсутствие значимых различий в α -разнообразии, у пациентов с эпилепсией в кишечнике отмечено в целом более низкое значение титров бактерий родов *Roseburia*, *Blautia*, *Dialister*. Параллельно с этим отмечается, что при эпилепсии титр бактерий кишечника, ассоциированных с нейровоспалением, повышен [64]. Кроме того, в клинических исследованиях отмечена взаимосвязь между длительным применением антибиотиков и увеличением риска судорожных приступов при эпилепсии [65]. Вероятно, по аналогии с воспалительными заболеваниями кишечника, изменение состава кишечной микробиоты может быть как следствием эпилепсии, так и причиной её отягощения, замыкая таким образом порочный круг в патогенезе этого заболевания. Тем не менее, накопленные клинические данные о связи кишечной микробиоты с эпилептогенезом весьма разрозненны по выраженности эффектов, что указывает на необходимость дальнейших исследований.

Коррекция кишечной микробиоты при эпилепсии как перспективный подход к её терапии. Нормализация микробиоты может оказывать позитивные эффекты в условиях эпилептогенеза. В частности, показано, что титр бактероидов кишечника, который снижен при эпилепсии, отрицательно коррелирует с системным уровнем провоспалительного цитокина IL-17 [66, 67]. При этом установлено, что содержание IL-17 в крови и ликворе пациентов с эпилепсией повышено и тесно коррелирует с частотой и тяжестью приступов [68, 69]. Позитивные эффекты микробиоты в условиях нейровоспаления связывают с действием КЖК, которые способны подавлять синтез и секрецию цитокинов в том числе в мозге, так как в норме свободно проникают через ГЭБ [70, 71].

В настоящее время проводятся экспериментальные и клинические исследования эффективности способов нормализации состава микробиоты кишечника при различных заболеваниях, в том числе при эпилепсии. Среди таких способов – применение пробиотиков, пребиотиков и их комбинации (синбиотиков), а также трансплантация фекальной микробиоты (FMT). Среди пробиотических микроорганизмов в исследованиях чаще всего применяются бифидобактерии, лактобациллы и термофильный стрептококк. В качестве пребиотиков чаще всего используются фруктоолигосахариды и инулин. В экспериментальных моделях показано противосудорожное [72] и нейропротективное [36] действие бифидобактерий, применяемых в качестве монопробиотика. При этом эффекты ассоциированы со снижением факторов нейровоспаления – активации нейроглии и повышенной концентрации в мозге провоспалительных цитокинов (IL-6, TNF α , IL-1 β , IL-17). Аналогичные результаты получены в случае применения синбиотиков [73, 74]. Эффективность нутритивных методов модификации кишечной микробиоты в уменьшении количества судорог у пациентов с эпилепсией показана и в клинических исследованиях [75, 76]. Вместе с тем, в проводимых исследованиях методологические различия (формы

эпилепсии, возраст пациентов, состав пробиотиков, режим и дозы их введения) указывают на необходимость дальнейшего накопления клинического материала.

Трансплантация фекальной микробиоты от здоровых доноров в последние годы рассматривается как альтернативный способ нормализации кишечной микробиоты при различных заболеваниях, в том числе при эпилепсии [77]. FMT предполагает перенос максимального числа микроорганизмов кишечника, в том числе некультивируемых облигатно анаэробных бактерий (фузобактерии, бактероиды и др.), титр которых, как было отмечено выше, существенно изменяется при эпилепсии. Тем не менее, количество завершенных исследований в этой области еще невелико. Так, несколько экспериментальных исследований показали эффективность FMT, в том числе в модели посттравматической эпилепсии [78] и модели абсансов [79]. Отдельные клинические случаи указывают на перспективы применения FMT при лечении эпилепсии, в том числе с коморбидными воспалительными заболеваниями кишечника [80, 81].

Заключение. Накопленные научные данные указывают на то, что кишечная микробиота оказывает существенное влияние на работу головного мозга. Это влияние играет важную роль в патогенезе многих неврологических заболеваний, в том числе эпилепсии. Важное значение в реализации кишечно-мозговых взаимодействий имеют процессы модуляции иммунитета в кишечнике, мозге и на системном уровне. Среди метаболитов кишечной микробиоты для дальнейшего изучения в контексте патогенеза и лечения эпилепсии наиболее перспективны короткоцепочечные жирные кислоты.

Ключевыми группами бактерий кишечника, титр которых изменяется при эпилепсии являются бактероиды, актинобактерии и фузобактерии. Вместе с тем, применение в качестве пробиотиков бифидобактерий и лактобацилл показывает свою эффективность как в экспериментальных моделях эпилепсии, так и в клинических исследованиях, в том числе за счет подавления нейровоспаления. Перспективным способом нормализации кишечной микробиоты при эпилепсии представляется также трансплантация кишечной микробиоты от здоровых доноров. Нормализация кишечной микробиоты с помощью таких подходов может служить одним из лечебных факторов при эпилепсии, в том числе в условиях коморбидных воспалительных заболеваний кишечника. Для подтверждения этих предположений требуются дальнейшие экспериментальные и клинические исследования в данном направлении.

Литература:

- [1]. Del Chierico F. et al. Pathophysiology of Type 1 Diabetes and Gut Microbiota Role // *Int J Mol Sci.* 2022. Vol. 23, No. 23. P. 14650.
- [2]. Gurung M. et al. Role of gut microbiota in type 2 diabetes pathophysiology // *EBioMedicine.* 2020. Vol. 51. P. 102590.
- [3]. Barcik W. et al. The Role of Lung and Gut Microbiota in the Pathology of Asthma // *Immunity.* 2020. Vol. 52, No. 2. P. 241–255.
- [4]. Penders J. et al. Gut microbiota composition and development of atopic manifestations in infancy: the KOALA Birth Cohort Study // *Gut.* 2007. Vol. 56. P. 661–667.
- [5]. Albillos A., de Gottardi A., Rescigno M. The gut-liver axis in liver disease: Pathophysiological basis for therapy // *J Hepatol.* 2020. Vol. 72, No. 3. P. 558–577.
- [6]. Fu L. et al. Microbiota-bone axis in ageing-related bone diseases // *Front Endocrinol (Lausanne).* 2024. Vol. 15. P. 1414350.
- [7]. Tsuji K. et al. The Gut-Kidney Axis in Chronic Kidney Diseases // *Diagnostics (Basel).* 2024. Vol. 15, No. 1. P. 21.
- [8]. Wang L. et al. The Bidirectional Gut-Lung Axis in Chronic Obstructive Pulmonary Disease // *Am J Respir Crit Care Med.* 2023. Vol. 207, No. 9. P. 1145–1160.
- [9]. Jaimez-Alvarado S. et al. Gut-Heart Axis: Microbiome Involvement in Restrictive Cardiomyopathies // *Biomedicines.* 2025. Vol. 13, No. 1. P. 144.
- [10]. Zhu H., Wang W., Li Y. The interplay between microbiota and brain-gut axis in epilepsy treatment // *Front Pharmacol.* 2024. Vol. 15. P. 1276551.

- [11]. 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.
- [12]. Ding M. et al. Microbiota-Gut-Brain Axis and Epilepsy: A Review on Mechanisms and Potential Therapeutics // *Front Immunol*. 2021. Vol. 12. P. 742449.
- [13]. Stilling R.M., Dinan T.G., Cryan J.F. Microbial genes, brain & behaviour - epigenetic regulation of the gut-brain axis // *Genes Brain Behav*. 2014. Vol. 13, No. 1. P. 69–86.
- [14]. Barbara G. et al. Interactions between commensal bacteria and gut sensorimotor function in health and disease // *Am J Gastroenterol*. 2005. Vol. 100, No. 11. P. 2560–2568.
- [15]. Clarke G. et al. The microbiome-gut-brain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner // *Mol Psychiatry*. 2013. Vol. 18, No. 6. P. 666–673.
- [16]. Diaz Heijtz R. et al. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011. Vol. 108, No. 7. P. 3047–3052.
- [17]. Sudo N. et al. Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice // *J Physiol*. 2004. Vol. 558, No. 1. P. 263–275.
- [18]. Neufeld K.M. et al. Reduced anxiety-like behavior and central neurochemical change in germ-free mice // *Neurogastroenterol Motil*. 2011. Vol. 23, No. 3. P. 255–264.
- [19]. Demaude J. et al. Phenotypic changes in colonocytes following acute stress or activation of mast cells in mice: implications for delayed epithelial barrier dysfunction // *Gut*. 2006. Vol. 55, No. 5. P. 655–661.
- [20]. Alonso C. et al. Maladaptive intestinal epithelial responses to life stress may predispose healthy women to gut mucosal inflammation // *Gastroenterology*. 2008. Vol. 135, No. 1. P. 163–172.
- [21]. Ferrara C. et al. Microbiota and IBD: Current knowledge and future perspectives // *Dig Liver Dis*. 2024. Vol. 56.
- [22]. Sokol H. et al. Fecal microbiota transplantation to maintain remission in Crohn’s disease: a pilot randomized controlled study // *Microbiome*. 2020. Vol. 8, No. 1. P. 12.
- [23]. Vich Vila A. et al. Gut microbiota composition and functional changes in inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome // *Sci Transl Med*. 2018. Vol. 10, No. 472. P. eaap8914.
- [24]. Lange K. et al. Effects of Antibiotics on Gut Microbiota // *Dig Dis*. 2016. Vol. 34, No. 3. P. 260–268.
- [25]. Bemark M. et al. Gut-associated lymphoid tissue: a microbiota-driven hub of B cell immunity // *Trends Immunol*. 2024. Vol. 45, No. 3. P. 211–223.
- [26]. Brown E.M., Sadarangani M., Finlay B.B. The role of the immune system in governing host-microbe interactions in the intestine // *Nat Immunol*. 2013. Vol. 14, No. 7. P. 660–667.
- [27]. Chen L. et al. Interactions between toll-like receptors signaling pathway and gut microbiota in host homeostasis // *Immun Inflamm Dis*. 2024. Vol. 12, No. 3. P. e1356..
- [28]. Ma Z. et al. A systematic framework for understanding the microbiome in human health and disease: from basic principles to clinical translation // *Signal Transduct Target Ther*. 2024. Vol. 9, No. 1. P. 237.
- [29]. Martin-Gallausiaux C. et al. SCFA: mechanisms and functional importance in the gut // *Proc Nutr Soc*. 2021. Vol. 80, No. 1. P. 37–49.
- [30]. Min B.H. et al. Gut microbiota-derived indole compounds attenuate metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease by improving fat metabolism and inflammation // *Gut Microbes*. 2024. Vol. 16. P. 2307568.
- [31]. Duah M. et al. Free fatty acid receptor-4 regulates T-cell-mediated allogeneic reaction through activating an aryl hydrocarbon receptor pathway // *Acta Pharm Sin B*. 2025. Vol. 15, No. 1. P. 224–238.
- [32]. Lavoie S. et al. Expression of Free Fatty Acid Receptor 2 by Dendritic Cells Prevents Their Expression of Interleukin 27 and Is Required for Maintenance of Mucosal Barrier and Immune Response Against Colorectal Tumors in Mice // *Gastroenterology*. 2020. Vol. 158, No. 5. P. 1359-1372.e9
- [33]. Wang B., Zhou Z., Li L. Gut Microbiota Regulation of AHR Signaling in Liver Disease // *Biomolecules*. 2022. Vol. 12, No. 9. P. 1244.
- [34]. Monteleone I. et al. Aryl hydrocarbon receptor-induced signals up-regulate IL-22 production and inhibit inflammation in the gastrointestinal tract // *Gastroenterology*. 2011. Vol. 141, No. 1. P. 237–248.
- [35]. Ansaldo E., Farley T.K., Belkaid Y. Control of Immunity by the Microbiota // *Annu Rev Immunol*. 2021. Vol. 39. P. 449–479.
- [36]. Zubareva O.E. et al. Beneficial Effects of Probiotic *Bifidobacterium longum* in a Lithium-Pilocarpine Model of Temporal Lobe Epilepsy in Rats // *Int J Mol Sci*. 2023. Vol. 24, No. 9. P. 8451.
- [37]. Yamanaka G. et al. Links between Immune Cells from the Periphery and the Brain in the Pathogenesis of Epilepsy: A Narrative Review // *Int J Mol Sci*. 2021. Vol. 22, No. 9. P. 4395.

- [38]. *Hollis A., Lukens J.R.* Role of inflammasomes and neuroinflammation in epilepsy // *Immunol Rev.* 2025. Vol. 329, No. 1. P. e13421.
- [39]. *Sanz P., Garcia-Gimeno M.A.* Reactive Glia Inflammatory Signaling Pathways and Epilepsy // *Int J Mol Sci.* 2020. Vol. 21, No. 11. P. 4096.
- [40]. *Khakh B.S., Sofroniew M.V.* Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits // *Nat Neurosci.* 2015. Vol. 18, No. 7. P. 942–953.
- [41]. *Ginhoux F. et al.* Origin and differentiation of microglia // *Front Cell Neurosci.* 2013. Vol. 7. P. 45.
- [42]. *Bosco D.B., Tian D.-S., Wu L.-J.* Neuroimmune interaction in seizures and epilepsy: focusing on monocyte infiltration // *FEBS J.* 2020. Vol. 287, No. 12. P. 2425–2437.
- [43]. *Rothhammer V. et al.* Microglial control of astrocytes in response to microbial metabolites // *Nature.* 2018. Vol. 557, No. 7707. P. 724–728.
- [44]. *Rothhammer V. et al.* Type I interferons and microbial metabolites of tryptophan modulate astrocyte activity and central nervous system inflammation via the aryl hydrocarbon receptor // *Nat Med.* 2016. Vol. 22, No. 6. P. 586–597.
- [45]. *Yang L. et al.* Affective Immunology: The Crosstalk Between Microglia and Astrocytes Plays Key Role? // *Front Immunol.* 2020. Vol. 11. P. 1818.
- [46]. *Djukic M. et al.* Circulating monocytes engraft in the brain, differentiate into microglia and contribute to the pathology following meningitis in mice // *Brain.* 2006. Vol. 129, No. 9. P. 2394–2403.
- [47]. *Erny D. et al.* Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS // *Nat Neurosci.* 2015. Vol. 18, No. 7. P. 965–977.
- [48]. *Braniste V. et al.* The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice // *Sci Transl Med.* 2014. Vol. 6, No. 263. P. 263ra158.
- [49]. *Welcome M.O.* Gut Microbiota Disorder, Gut Epithelial and Blood-Brain Barrier Dysfunctions in Etiopathogenesis of Dementia: Molecular Mechanisms and Signaling Pathways // *Neuromolecular Med.* 2019. Vol. 21, No. 3. P. 205–226.
- [50]. *Obrenovich M.E.M.* Leaky Gut, Leaky Brain? // *Microorganisms.* 2018. Vol. 6, No. 4. P. 107.
- [51]. *Logsdon A.F. et al.* Gut reactions: How the blood-brain barrier connects the microbiome and the brain // *Exp Biol Med (Maywood).* 2018. Vol. 243, No. 2. P. 159–165.
- [52]. *McCusker R.H., Kelley K.W.* Immune-neural connections: how the immune system's response to infectious agents influences behavior // *J Exp Biol.* 2013. Vol. 216, No. 1. P. 84–98.
- [53]. *Ait-Belgnaoui A. et al.* Prevention of gut leakiness by a probiotic treatment leads to attenuated HPA response to an acute psychological stress in rats // *Psychoneuroendocrinology.* 2012. Vol. 37, No. 11. P. 1885–1895.
- [54]. *McKernan D.P. et al.* Enhanced peripheral toll-like receptor responses in psychosis: further evidence of a pro-inflammatory phenotype // *Transl Psychiatry.* 2011. Vol. 1. P. e36.
- [55]. *Riazi K. et al.* Microglial activation and TNF α production mediate altered CNS excitability following peripheral inflammation // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008. Vol. 105, No. 44. P. 17151–17156.
- [56]. *De Caro C. et al.* Intestinal inflammation increases convulsant activity and reduces antiepileptic drug efficacy in a mouse model of epilepsy // *Sci Rep.* 2019. Vol. 9, No. 1. P. 13983.
- [57]. *Barnes S.E. et al.* Brain profiling in murine colitis and human epilepsy reveals neutrophils and TNF α as mediators of neuronal hyperexcitability // *J Neuroinflammation.* 2021. Vol. 18, No. 1. P. 199.
- [58]. *Xie G. et al.* Ketogenic diet poses a significant effect on imbalanced gut microbiota in infants with refractory epilepsy // *World J Gastroenterol.* 2017. Vol. 23, No. 33. P. 6164–6171.
- [59]. *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.
- [60]. *Liu T. et al.* Altered intestinal microbiota composition with epilepsy and concomitant diarrhea and potential indicator biomarkers in infants // *Front Microbiol.* 2022. Vol. 13. P. 1081591.
- [61]. *Peng A. et al.* Altered composition of the gut microbiome in patients with drug-resistant epilepsy // *Epilepsy Res.* 2018. Vol. 147. P. 102–107.
- [62]. *Şafak B. et al.* The gut microbiome in epilepsy // *Microb Pathog.* 2020. Vol. 139. P. 103853.
- [63]. *Yang R. et al.* A meta-analysis of the changes in the Gut microbiota in patients with intractable epilepsy compared to healthy controls // *J Clin Neurosci.* 2024. Vol. 120. P. 213–220.
- [64]. *Mousavi S.M., Younesian S., Ejtahed H.-S.* The alteration of gut microbiota composition in patients with epilepsy: A systematic review and meta-analysis // *Microb Pathog.* 2025. Vol. 199. P. 107266.
- [65]. *Zou S., Yang X., Zhou L.* Gut microbiota in epilepsy: How antibiotics induce dysbiosis and influence seizure susceptibility // *Microbiol Res.* 2025. Vol. 298. P. 128225.

- [66]. Chow J., Mazmanian S.K. Getting the bugs out of the immune system: do bacterial microbiota "fix" intestinal T cell responses? // *Cell Host Microbe*. 2009. Vol. 5, No. 1. P. 8–12.
- [67]. Ivanov I.I. et al. Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine // *Cell Host Microbe*. 2008. Vol. 4, No. 4. P. 337–349.
- [68]. Lee Y.K. et al. Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011. Vol. 108, Suppl 1. P. 4615–4622.
- [69]. Burfeind K.G. et al. Baseline characterization of epilepsy in an onchocerciasis endemic area of the Democratic Republic of Congo // *Brain Res Bull*. 2019. Vol. 145. P. 45–52.
- [70]. Kim M. et al. Gut Microbial Metabolites Fuel Host Antibody Responses // *Cell Host Microbe*. 2016. Vol. 20, No. 2. P. 202–214.
- [71]. Honda K., Littman D.R. The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease // *Nature*. 2016. Vol. 535, No. 7610. P. 75–84.
- [72]. Ishii T., Kaya M., Muroi Y. Oral Administration of Probiotic *Bifidobacterium breve* Ameliorates Tonic-Clonic Seizure in a Pentylentetrazole-Induced Kindling Mouse Model via Integrin-Linked Kinase Signaling // *Int J Mol Sci*. 2024. Vol. 25, No. 2. P. 9259.
- [73]. Kızılaslan N., Sumbul O., Aygun H. The Beneficial Effect of Probiotics Supplementation on Penicillin-Induced Focal Seizure in Rats // *Neurochem Res*. 2022. Vol. 47, No. 5. P. 1395–1404.
- [74]. Kilinc E. et al. Protective effects of long-term probiotic mixture supplementation against pentylentetrazole-induced seizures, inflammation and oxidative stress in rats // *J Nutr Biochem*. 2021. Vol. 98. P. 108830.
- [75]. Shariatmadari F. et al. The effect of synbiotics in the treatment of drug-resistant epilepsy and the parental burden of caregivers: a single-arm pretest-posttest trial // *BMC Pediatr*. 2024. Vol. 24, No. 1. P. 666.
- [76]. Gómez-Eguílaz M. et al. The beneficial effect of probiotics as a supplementary treatment in drug-resistant epilepsy: a pilot study // *Benef Microbes*. 2018. Vol. 9, No. 6. P. 875–881.
- [77]. Yadegar A. et al. Fecal microbiota transplantation: current challenges and future landscapes // *Clin Microbiol Rev*. 2024. Vol. 37, No. 1. P. e0006022.
- [78]. Medel-Matus J.-S. et al. Modification of post-traumatic epilepsy by fecal microbiota transfer // *Epilepsy Behav*. 2022. Vol. 134. P. 108860.
- [79]. Citraro R. et al. First evidence of altered microbiota and intestinal damage and their link to absence epilepsy in a genetic animal model, the WAG/Rij rat // *Epilepsia*. 2021. Vol. 62, No. 2. P. 529–541.
- [80]. He Z. et al. Fecal microbiota transplantation cured epilepsy in a case with Crohn's disease: The first report // *World J Gastroenterol*. 2017. Vol. 23, No. 19. P. 3565–3568.
- [81]. Ravizza T. et al. Intestinal microbiome alterations in pediatric epilepsy: Implications for seizures and therapeutic approaches // *Epilepsia Open*. 2025.

S. A. KOLYHAN, T. B. MELIK-KASUMOV

THE ROLE OF IMMUNE PROCESSES IN THE REALIZATION OF GUT-BRAIN INTERACTIONS IN EPILEPTOGENESIS

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

Summary

The article reviews current data on the role of microbiota in the development of epilepsy (epileptogenesis) from the point of view of immune processes. The article describes the concept of the gut-brain axis, provides data on the influence of intestinal microbiota on the immune system and neuroinflammation, as well as the role of the intestinal and blood-brain barriers in the implementation of gut-brain interactions in epilepsy. The article also presents information on changes in the composition of intestinal microbiota in patients with epilepsy, as well as the results of experimental and clinical studies of the effectiveness of methods for normalizing intestinal microbiota.

Keywords: intestinal microbiota, gut-brain axis, immunity, neuroinflammation, epilepsy.

ОТ РЕДАКЦИИ

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 не менее 15000 знаков с пробелами, 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, 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.

Рассмотрение статей на предмет публикации осуществляется **после предоставления копии квитанции о подписке на журнал**. Статьи рекламного характера и иные виды рекламной информации публикуются после предварительной оплаты.

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

² Учреждение образования «Белорусский государственный университет», г. Минск, Республика 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 должны быть представлены в виде, исключающем их доработку. 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.

В электронной версии помимо размещения в статье, рисунки представляются в виде отдельных файлов в формате JPG, TIF.

Таблицы

Таблицы должны быть отпечатаны через два интервала, иметь порядковые номера (арабские, например: таблица 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., Матеекин 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.

От редакции

НОВОСТИ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК 2025, Т. 25, № 2

Набор и верстка *Ерофеева А.-М. В., Филипович Т. А.*
Дизайн обложки *Саркисов С. В.*

Подписано в печать с готового оригинал-макета заказчика 19.06.2025. Формат 60×84 ¹/₈. Бумага офсетная.
Печать цифровая. Усл. печ. л. 16,97. уч. изд. л. 16,4. Тираж 75 экз. заказ 128

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