

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«КРЫМСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ В. И. ВЕРНАДСКОГО»  
МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ ИМЕНИ С. И. ГЕОРГИЕВСКОГО

# КРЫМСКИЙ ЖУРНАЛ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ И КЛИНИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ

CRIMEAN JOURNAL OF EXPERIMENTAL AND CLINICAL MEDICINE

2021, том 11, № 3

## РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

*А. В. Кубышкин* (главный редактор)  
*И. И. Фомочкина* (заместитель главного редактора)  
*М. А. Плотникова* (ответственный секретарь)  
*В. А. Белоглазов, К. А. Ефетов, А. М. Кацев*

## РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

*Л. Дубаске* (Вашингтон, США), *Е. В. Евстафьева* (Симферополь, Россия),  
*В. П. Завьялов* (Турку, Финляндия), *И. Л. Кляритская* (Симферополь, Россия),  
*Я. Коки* (Люблин, Польша), *Ю. Л. Криворутченко* (Симферополь, Россия),  
*А. В. Матвеев* (Симферополь, Россия), *О. Матсуо* (Осакасама, Япония),  
*В. Ю. Михайличенко* (Симферополь, Россия), *С. Н. Орлов* (Монреаль, Канада),  
*А. В. Петров* (Симферополь, Россия), *А. Петросян* (Оаха, США),  
*М. Покорский* (Ополе, Польша), *О. А. Притуло* (Симферополь, Россия),  
*А. Г. Резников* (Киев, Украина), *И. Д. Сапегин* (Симферополь, Россия),  
*Г. М. Тарман* (Инсбрук, Австрия), *Т. Трояновский* (Люблин, Польша),  
*С. Э. Шибанов* (Симферополь, Россия), *Я. М. Шуба* (Киев, Украина),  
*А. Б. Хайтович* (Симферополь, Россия)

На первой странице обложки — репродукция картины Роберта Тома «Сушрута-врач-хирург Древней Индии»

АДРЕС РЕДАКЦИИ:  
295051, бульвар Ленина, 5/7, г. Симферополь, ФГАОУ ВО «КФУ имени В. И. Вернадского»  
Медицинская академия имени С. И. Георгиевского  
E-mail: [cjest\\_ma@mail.ru](mailto:cjest_ma@mail.ru)

Журнал является правопреемником Трудов КГМУ, издающихся с 1935 г.

Журнал зарегистрирован Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций Российской Федерации. Свидетельство ПИ № ФС77-61787 от 18 мая 2015 г.

Индекс издания ISSN: 2224-6444 (печатная версия), 2244-6452 (online)

С 07 декабря 2015 года журнал включен в «Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук».

В соответствии с распоряжением Минобрнауки России от 28 декабря 2018 года № 90-р, журнал считается включенным в Перечень ВАК по следующим научным специальностям и соответствующим им отраслям наук:

03.01.02 – Биофизика (медицинские науки); 03.01.03 – Молекулярная биология (биологические науки); 03.01.04 – Биохимия (медицинские науки); 03.01.07 – Молекулярная генетика (биологические науки); 03.01.08 – Биоинженерия (биологические науки); 03.01.09 – Математическая биология, биоинформатика (медицинские науки); 03.03.01 – Физиология (медицинские науки); 03.03.02 – Антропология (медицинские науки); 03.03.03 – Иммунология (медицинские науки); 03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология (медицинские науки); 03.03.05 – Биология развития, эмбриология (медицинские науки); 03.03.06 – Нейробиология (медицинские науки); 14.03.01 – Анатомия человека (медицинские науки); 14.03.02 – Патологическая анатомия (медицинские науки); 14.03.03 – Патологическая физиология (медицинские науки); 14.03.05 – Судебная медицина (медицинские науки); 14.03.06 – Фармакология, клиническая фармакология (медицинские науки); 14.03.07 – Химиотерапия и антибиотики (медицинские науки); 14.03.08 – Авиационная, космическая и морская медицина (медицинские науки); 14.03.09 – Клиническая иммунология, аллергология (медицинские науки); 14.03.10 – Клиническая лабораторная диагностика (медицинские науки); 14.03.11 – Восстановительная медицина, спортивная медицина, лечебная физкультура, курортология и физиотерапия (медицинские науки).

Подписной индекс издания в каталоге Агентства «Роспечать» — 80124

Рекомендовано к печати ученым советом Медицинской академии имени С. И. Георгиевского (протокол № 7 от 26.08.2021)

**УЧРЕДИТЕЛЬ:**

ФГАОУ ВО «КРЫМСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ В. И. ВЕРНАДСКОГО»  
МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ ИМЕНИ С. И. ГЕОРГИЕВСКОГО

## СОДЕРЖАНИЕ

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

## ORIGINAL ARTICLES

<b>Демяшкин Г. А.</b> ИММУНОФЕНОТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПРОЛИФЕРАЦИИ И АПОПТОЗА ГАМЕТ САМЦОВ КРЫС ПОСЛЕ ЛОКАЛЬНОГО ОБЛУЧЕНИЯ .....	6
<b>Demyashkin G. A.</b> IMMUNOPHENOTYPICAL FEATURES OF THE LIFE CYCLE OF GAMETS IN MALE RATS AFTER LOCAL IRRADIATION .....	6
<b>Додохова М. А., Котиева И. М., Сафроненко А. В., Алхусейн-Кулягинова М. С., Милаева Е. Р., Шпаковский Д. Б., Терехов А. Ю., Сергеева Е. О.</b> ВЛИЯНИЕ ГИБРИДНЫХ ОЛОВООРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ В МАКСИМАЛЬНО ЭФФЕКТИВНОЙ ДОЗЕ НА РОСТ И АКТИВНОСТЬ МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ МЕЛАНОМЫ В16 У МЫШЕЙ ЛИНИИ C57BL/6 .....	12
<b>Dodokhova M. A., Kotieva I. M., Safronenko A. V., Alkhuseyn-Kulyaginova M. S., Milaeva E. R., Shpakovsky D. B., Terekhov A. Yu., Sergeeva E. O.</b> EFFECT OF HYBRID ORGANOTIN COMPOUNDS AT THE MAXIMUM EFFECTIVE DOSE ON THE GROWTH AND METASTASIS ACTIVITY OF B16 MELANOMA IN C57BL/6 MICE .....	12
<b>Игнатенко Т. С., Майлян Э. А., Капанадзе Г. Д.</b> ЦИТОКИНЫ И МАРКЕРЫ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ У ЖЕНЩИН С АУТОИММУННЫМ ТИРЕОИДИТОМ В ДИНАМИКЕ ЛЕЧЕНИЯ .....	18
<b>Ignatenko G. A., Maylyan E. A., Kapanadze G. D.</b> CYTOKINES AND THYROID MARKERS IN BLOOD SERUM IN WOMEN WITH AUTOIMMUNE THYROIDITIS IN THE COURSE OF TREATMENT .....	18
<b>Миронюк И. С., Бирюкова Е. А., Чуян Е. Н., Асанова А. Р.</b> ИЗМЕНЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЭЛЕКТРОКАРДИОГРАММЫ КРЫС ПОД ВЛИЯНИЕМ АЦЕТИЛСАЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ И ЕЕ КОМПЛЕКСНЫХ СОЕДИНЕНИЙ С МЕТАЛЛАМИ .....	25
<b>Mironyuk I. S., Biryukova E. A., Chuyan E. N., Asanova A. R.</b> CHANGES IN ELECTROCARDIOGRAM PARAMETERS RATS UNDER THE INFLUENCE OF ACETYLSALICYLIC ACID AND ITS COMPLEX COMPOUNDS WITH METALS .....	25
<b>Никитина О. В., Кутя С. А., Кривенцов М. А.</b> СТРУКТУРНЫЕ ПРЕОБРАЗОВАНИЯ ЖЕЛУДКА КРЫС ЮВЕНИЛЬНОГО ВОЗРАСТА НА ФОНЕ РЕГУЛЯРНОГО ВВЕДЕНИЯ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО НАПИТКА .....	34
<b>Nikitina O. V., Kutia S. A., Kriventsov M. A.</b> STRUCTURAL TRANSFORMATIONS OF THE STOMACH OF JUVENILE RATS AFTER REGULAR ADMINISTRATION OF AN ENERGY DRINK .....	34
<b>Франциянц Е. М., Нескубина И. В., Каплиева И. В., Сурикова Е. И., Черярина Н. Д., Бандовкина В. А., Погорелова Ю. А., Шихлярова А. И., Трепитаки Л. К., Немашкалова Л. А., Позднякова В. В., Солдаткина Н. В., Маслов А. А.</b> ПОЛОВЫЕ РАЗЛИЧИЯ В СОДЕРЖАНИИ СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ В МИТОХОНДРИЯХ КЛЕТОК СЕРДЦА НА ЭТАПАХ РАЗВИТИЯ МЕЛАНОМЫ В16/F10, СОПРЯЖЕННОЙ С ХРОНИЧЕСКОЙ НЕЙРОГЕННОЙ БОЛЬЮ .....	40

<b>Frantsiyants E. M., Neskubina I. V., Kaplieva I. V., Surikova E. I., Cheryarina N. D., Bandovkina V. A., Pogorelova Yu. A., Shikhlyarova A. I., Trepitaki L. K., Nemashkalova L. A., Pozdnyakova V. V., Soldatkina N. V., Maslov A. A.</b>	
GENDER DIFFERENCES IN LEVELS OF STEROID HORMONES IN HEART CELL MITOCHONDRIA AT THE STAGES OF B16/F10 MELANOMA DEVELOPMENT COMBINED WITH CHRONIC NEUROGENIC PAIN.....	40
<b>Франциянц Е. М., Бандовкина В. А., Каплиева И. В., Сурикова Е. И., Нескубина И. В., Трепитаки Л. К., Черярина Н. Д., Погорелова Ю. А., Качесова П. С., Горошинская И. А., Котиева И. М., Морозова М. И., Туманян С. В.</b>	
СОДЕРЖАНИЕ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ 9 И КОРТИЗОЛА В ОРГАНАХ-МИШЕНЯХ ДИАБЕТИЧЕСКИХ ОСЛОЖНЕНИЙ ПРИ РОСТЕ КАРЦИНОМЫ ГЕРЕНА НА ФОНЕ САХАРНОГО ДИАБЕТА У КРЫС .....	48
<b>Frantsiyants E. M., Bandovkina V. A., Kaplieva I. V., Surikova E. I., Neskubina I. V., Trepitaki L. K., Cheryarina N. D., Pogorelova Yu. A., Kachesova P. S., Goroshinskaya I. A., Kotieva I. M., Morozova M. I., Tumanyan S. V.</b>	
LEVELS OF METALLOPROTEINASE-9 AND CORTISOL IN TARGET ORGANS OF DIABETES COMPLICATIONS DURING THE GROWTH OF GUERIN'S CARCINOMA IN RATS .....	48
<b>Франциянц Е. М., Каплиева И. В., Трепитаки Л. К., Сурикова Е. И., Бандовкина В. А., Нескубина И. В., Погорелова Ю. А., Черярина Н. Д., Котиева И. М., Шумарин К. А.</b>	
ВЛИЯНИЕ MMP-9 НА РОСТ И РАЗВИТИЕ ПЕРВИЧНО-МНОЖЕСТВЕННЫХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ В УСЛОВИЯХ ПЕРВИЧНОГО ИММУНОДЕФИЦИТА.....	58
<b>Frantsiyants E. M., Kaplieva I. V., Trepitaki L. K., Surikova E. I., Bandovkina V. A., Neskubina I. V., Pogorelova Yu. A., Cheryarina N. D., Kotieva I. M., Shumarin K. A.</b>	
EFFECT OF MMP9 ON GROWTH AND DEVELOPMENT OF EXPERIMENTAL MULTIPLE PRIMARY TUMORS IN PRIMARY IMMUNODEFICIENCY .....	58
<b>Штыгашева О. В., Агеева Е. С., Гузарь Я. Р.</b>	
МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ ПАЦИЕНТОВ С РАКОМ ТОЛСТОЙ КИШКИ .....	63
<b>Shtygasheva O. V., Ageeva E. S., Guzar Ya. R.</b>	
METABOLIC PROFILE OF COLOR CANCER PATIENTS .....	63
<b>ИСТОРИЯ МЕДИЦИНЫ</b>	
<b>HISTORY OF MEDICINE</b>	
<b>Хайтович А. Б.</b>	
ПРОФЕССОРА КАФЕДРЫ: ОСНОВАТЕЛЬ И ПЕРВЫЙ ЗАВЕДУЮЩИЙ КАФЕДРОЙ ЩАСТНЫЙ СЕРГЕЙ МИХАЙЛОВИЧ .....	70
<b>Khaitovich A. B.</b>	
PROFESSOR OF DEPARTMENT: FOUNDER AND FIRST HEAD OF DEPARTMENT SHCHASTNY SERGEY MIKHAILOVICH .....	70
<b>КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ</b>	
<b>CLINICAL CASE</b>	
<b>Землянухина О. А., Остроушко И. П., Суворова И. М., Кривошеева Е. В., Калаев В. Н., Ларина А. В., Семенова Е. Ф.</b>	
ВЛИЯНИЕ ИММУНОТРОПНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ПРОТЕКАНИЕ ЦИТОКИНОВОГО ШТОРМА ПРИ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ (НА ПРИМЕРЕ КЛИНИЧЕСКОГО СЛУЧАЯ).....	77
<b>Zemlyanukhina O. A., Ostroushko I. P., Suvorova I. M., Krivosheeva E. V., Kalaev V. N., Larina A. V., Semenova E. F.</b>	
THE INFLUENCE OF IMMUNOTROPIC DRUGS ON THE CYTOKINE STORM IN CORONAVIRUS INFECTION (ON THE EXAMPLE OF A CLINICAL CASE) .....	77

## ОБЗОРЫ

## REVIEWS

**Буданов А. А., Медведев В. Л., Курзанов А. Н., Быков И. М., Басов А. А.,  
Русинова Т. В.**

ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ МАРКЕРЫ РЕЦИДИВИРОВАНИЯ МОЧЕКАМЕННОЙ БОЛЕЗНИ И РОЛЬ ИНГИБИТОРОВ  
КАМНЕОБРАЗОВАНИЯ ПРИ РЕЦИДИВИРУЮЩЕМ КАЛЬЦИЙ-ОКСАЛАТНОМ НЕФРОЛИТИАЗЕ .....85

**Budanov A. A., Medvedev V. L., Kurzanov A. N., Bykov I. M., Basov A. A.,  
Rusinova T. V.**

POTENTIAL MARKERS OF RECURRENCE OF UROLITHIASIS DISEASE AND THE ROLE OF STONE  
FORMATION INHIBITORS IN RECURRENT CALCIUM OXALATE NEPHROLITHIASIS .....85

**Дмитриевская М. И., Ибрагимова Д. Н., Усеинова А. Н., Ребик А. А.**

РОЛЬ ИНГИБИТОРОВ ИММУННЫХ КОНТРОЛЬНЫХ ТОЧЕК В РЕАЛИЗАЦИИ ПРОТИВОРАКОВОГО  
ИММУНИТЕТА .....93

**Dmitrievskaya M. I., Ibragimova D. N., Useinova A. N., Rebik A. A.**

THE ROLE OF IMMUNE CHECKPOINT INHIBITORS IN ANTITUMORAL IMMUNITY .....93

УДК 616.697-021.6.

DOI: 10.37279/2224-6444-2021-11-3-6-11

## ИММУНОФЕНОТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПРОЛИФЕРАЦИИ И АПОПТОЗА ГАМЕТ САМЦОВ КРЫС ПОСЛЕ ЛОКАЛЬНОГО ОБЛУЧЕНИЯ

Демяшкин Г. А.<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), г. Москва, Россия.<sup>2</sup>Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал «НМИЦ радиологии», Обнинск, Россия.

Для корреспонденции: Демяшкин Григорий Александрович, кандидат медицинских наук; e-mail: dr.dga@mail.ru

For correspondence: Grigory A. Demyashkin, PhD, e-mail: dr.dga@mail.ru

Information about authors:

Demyashkin G. A., <https://orcid.org/0000-0001-8447-2600>

### РЕЗЮМЕ

На долю «мужского фактора» приходится половина причин бездетности среди супружеских пар, для понимания этиопатогенетических механизмов данных нарушений сперматогенеза необходимо создание моделей на животных, в том числе с применением облучения. Кроме того, в клинической практике с успехом применяются методы лучевой терапии при лечении злокачественных новообразований. Учитывая рост количества злокачественных новообразований яичка необходимо усовершенствовать существующие методы и разрабатывать новые.

Цель исследования: молекулярно-биологическая оценка пролиферации и апоптоза гамет крыс-самцов после облучения электронами дозами 2 Гр, 8 Гр и 12 Гр.

Материал и методы. Самцы Wistar (220±20 г; 9 – 10 недель; n=40) были случайным образом поделены на контрольную (I; n=10) и опытные (II – IV; n=10 в каждой) группы в зависимости от дозы однократного прицельного облучения электронами тазового сегмента в проекции семенников: II – 2 Гр, III – 8 Гр, IV – 12 Гр, которые были изучены иммуногистохимическим методом с использованием антител к Ki-67, каспазе-3, Bcl-2 и p53

Результаты. Через неделю после облучения 2 Гр, 8 Гр и 12 Гр обнаружили увеличение уровня терминальной фазы апоптоза – каспазы-3 (25.0±0.1, 55.0±0.2 и 74.0±0.1 соответственно) и снижение маркера пролиферации Ki-67 (18.0±0.1, 8.0±0.3 и 2.0±0.1 соответственно) на фоне снижения степени маркирования антиапоптотического Bcl-2 (27.0±0.7, 15.5±0.7 и 7.0±0.2 соответственно) и повышения проапоптотического p53 факторов (33.0±0.1, 83.0±0.1 и 67.0±0.2 соответственно).

Заключение. В семеннике однократное облучение электронами приводит к резкому сдвигу пролиферативно-апоптотического баланса в сторону гибели половых клеток, в первую очередь сперматогоний.

**Ключевые слова:** сперматогенез, облучение, пролиферация, апоптоз, «NOVAC-11».

### IMMUNOPHENOTYPICAL FEATURES OF THE LIFE CYCLE OF GAMETS IN MALE RATS AFTER LOCAL IRRADIATION

Demyashkin G. A.<sup>1,2</sup><sup>1</sup>I. M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia<sup>2</sup>Medical Radiological Scientific Center named after A.F. Tsyba – branch of the National Medical Research Center of Radiology, Obninsk, Russia

### SUMMARY

The “male factor” accounts for half of the causes of childlessness among married couples; in order to understand the etiopathogenetic mechanisms of these spermatogenesis disorders, it is necessary to create animal models, including with the use of radiation. In addition, in clinical practice, the methods of radiation therapy are successfully used in the treatment of malignant neoplasms. Given the increase in the number of testicular malignant neoplasms, it is necessary to improve existing methods and develop new ones.

Aim of the study: molecular biological assessment of the proliferation and apoptosis of gametes in male rats after electron irradiation with doses of 2 Gy, 8 Gy and 12 Gy.

Material and methods. Wistar males (220 ± 20 g; 9 – 10 weeks; n = 40) were randomly divided into control (I; n=10) and experimental (II – IV; n=10 in each) group depending on the dose of a single sighting irradiation with electrons of the pelvic segment in the projection of the testes: II – 2 Gy, III – 8 Gy, IV – 12 Gy, which were studied by immunohistochemical method using antibodies to Ki-67, caspase-3, Bcl-2 and p53

Results. A week after irradiation with 2 Gy, 8 Gy, and 12 Gy, an increase in the level of the terminal phase of apoptosis, caspase-3 (25.0±0.1, 55.0±0.2 and 74.0±0.1, respectively), and a decrease in the proliferation marker Ki-67 (18.0±0.1, 8.0±0.3 and 2.0±0.1, respectively), a decrease of degree of antiapoptotic Bcl-2 (27.0±0.7, 15.5±0.7, and 7.0±0.2, respectively) and an increase of proapoptotic p53 (33.0±0.1, 83.0±0.1, and 67.0±0.2, respectively) factors.

Conclusion. In the testis, a single irradiation with electrons leads to a sharp shift in the proliferative-apoptotic balance towards the death of germ cells, primarily spermatogonia.

**Key words:** spermatogenesis, radiation, proliferation, apoptosis, «NOVAC-11».

На долю мужского бесплодия приходится половина причин бездетности среди супружеских пар [1; 2; 3], для понимания этиопатогенетических механизмов данных нарушений сперматогенеза необходимо создание моделей на животных, в том числе с применением облучения [4]. Кроме того, в клинической практике с успехом применяются методы лучевой терапии при лечении злокачественных новообразований. Учитывая рост количества злокачественных новообразований яичка необходимо усовершенствовать существующие методы и разрабатывать новые.

Семенник является одним из наиболее радиочувствительных органов уже при дозе облучения от 0,1 Гр и выше [5; 6]. При этом, в первую очередь наблюдается нарушение пролиферации и апоптоза половых клеток, в сторону их гибели через повреждение ДНК и окислительный стресс [7; 8]. Кроме того, апоптоз, возникающий в результате окислительного стресса, который усиливается под действием ионизирующего излучения, подавляет сперматогенез. Однако, некоторые авторы говорят о способности сперматогоний типа А выживать после лучевой терапии [9]. Уровни Ki-67, каспазы-3, Bcl-2 и p53 – важных маркеров клеточного цикла изменяются под действием облучения [9; 10]. В то же время, отсутствуют комплексные данные этих изменений в зависимости от вида, направленности и дозирования облучения в зависимости от используемого аппарата.

Результаты исследований свидетельствуют о более агрессивном воздействии прицельной радиации в сравнении с общим облучением, однако они не дают конкретный ответ на вопросы: как быстро происходит апоптоз мужских гамет, на каких стадиях сперматогенеза они наиболее уязвимы и как долго сохраняются эти патоморфологические признаки.

Именно поэтому подбор оптимальных доз излучения, их своевременная корректировка и нивелирование токсичности данной терапии – это ключевые моменты, которые влияют на оптимизацию лечения и становится все более важной задачей современной онкологии.

Цель исследования: молекулярно-биологическая оценка пролиферации и апоптоза гамет крыс-самцов после облучения электронами дозами 2 Гр, 8 Гр и 12 Гр.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Экспериментальное морфологическое исследование проводили на базах Сеченовского университета и Экспериментального сектора Медицинского радиологического научного центра имени А.Ф. Цыба.

*Животные для исследования in vivo.* Самцов крыс Wistar (220±20 г; 9–10 недель; n=40) содержали в виварии при контролируемой температуре (22°C) и световом периоде (12L:12D) со свободным доступом к воде и крысиному корму. Крысы случайным образом были разделены на контрольную (I; n=10) и опытные (II–IV; n=10 в каждой) группы в зависимости от дозы однократного прицельного облучения электронами (импульсным ускорителем «NOVAC-11») тазового сегмента в проекции семенников: II – 2 Гр, III – 8 Гр, IV – 12 Гр. С животными обращались с соблюдением всех асептических мер предосторожности. Все манипуляции осуществлялись согласно «Международным рекомендациям по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (ЕЭС, Страсбург, 1985), «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (ЕЭС, Страсбург, 1986), Хельсинской декларации и Руководствам по проведению медико-биологических исследований по уходу и использованию лабораторных животных (ILAR, DELS), а также одобрены Локальным этическим комитетом.

### *Ионизирующее излучение (IR).*

Животных подвергали локальному облучению тазового сегмента в дозе 8 Гр (мощность дозы 1 Гр/мин, энергия 10 МэВ и частота 9 Гц, размер поля – Ø 100 мм) с использованием линейного акселератора («NOVAC-11», Радиологическое отделение экспериментального корпуса МРНЦ имени А.Ф. Цыба, г. Обнинск, Россия). Данная установка позволяет получить пучок электронов с энергиями 4, 6, 8, 10 МэВ; пучок возможно отколимировать до Ø 30-100 мм с шагом по 10 мм; частоту бенчей в пучке можно регулировать от 1 до 24 Гц с шагом по 1 Гц. Мощность дозы была откалибрована с помощью физической дозиметрии группой радиационной безопасности в рамках требований стандартной калибровки в соответствии с Агентством по регулированию атомной энергии России. Животные всех групп (I–IV) выводили из эксперимента путем введения высоких доз анестетика (50 мг/мл пропофол, 50 мг/мл лидокаина гидрохлорид). Сроки умерщвления – на 84 сутки после облучения в соответствии с продолжительностью двух циклов сперматогенеза крыс (по 42 суток каждый). После плановой эвтаназии у крыс были изъяты семенники.

### *Морфологический блок.*

После извлечения оценивали внешний вид семенников, состояние паренхимы на разрезе, фиксировали в растворе Буэна, приготавливали парафиновые блоки, а затем срезы, которые

окрашивали гематоксилином и эозином согласно стандартной методике.

*Иммуногистохимический анализ (ИГХ)* проводили после депарафинизации и регидратации парафиновых срезов по стандартному протоколу в автоматическом режиме в иммуногистостейнере Bond-Max («Leica», Германия). Первичные кроличьи моноклональные антитела к: Ki-67 (clone SP6; RTU), каспазе-3 (clone ab2302, 1:300), Bcl-2 (clone E17; RTU) и p53 (clone SP5; RTU); вторичные – универсальные антитела («Cell Marque», США). Для каждого маркера выполняли контрольные исследования с целью исключения псевдоположительных и псевдонегативных результатов. Ядра клеток докрашивали гематоксилином Майера; срезы промывали под проточной водой; дегидратировали и заключали в бальзам.

Оценку результатов иммуногистохимических реакций по распределению окрашивания проводили по 3-балльной системе с подсчетом количества иммунопозитивных клеток в 10 случайно отобранных полях зрения при увеличении  $\times 400$  (в %): «-» – отсутствие, «+» – слабая (5 – 25% клеток, 1 балл), «++» – умеренная (25 – 50% клеток, 2 балла), «+++» – выраженная ( $\geq 51\%$  клеток, 3 балла).

*Статистический анализ.*

Полученные в результате подсчета данные обрабатывали с использованием компьютерной программы SPSS 12.00 for Windows statistical software package (IBM Analytics, США). При статистической обработке для оценки достоверности различий средних значений между группами использовались следующие непараметрические критерии U-критерий Манна–Уитни, со значимостью  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Морфологический количественный анализ и тестикулярная оценка. В срезах семенников контрольной группы наблюдали нормальную гистоархитектонику с физиологическим сперма-

тогенезом; оценка по Johnsen –  $10 \pm 0,82$  балла. В образцах опытных групп выявили уменьшение количества половых клеток, признаки дегенеративных изменений и лизиса сперматид и сперматозоидов, а также появление интенсивных пикнотичных ядер у первичных сперматоцитов. Сперматогенный эпителий сморщен, в межканальцевом пространстве – интерстициальный отек и стаз в просветах кровеносных сосудов. Наиболее глубокое поражение канальцев, вплоть до аплазии сперматогенного эпителия и обширной вакуолизации наблюдали в группах облучения 8 Гр (оценка по Johnsen –  $5.0 \pm 0.1$ ) и 12 Гр (оценка по Johnsen –  $3.0 \pm 1.1$ ) по сравнению с дозой воздействия 2 Гр (оценка по Johnsen –  $8.0 \pm 0.4$ ). Прогрессировали деструкция и сморщивание канальцев, аплазия эпителия и его вакуолизация.

*Иммуногистохимический анализ.* Во всех исследуемых группах отмечали положительные ИГХ-реакции на Ki-67, каспазу-3, Bcl-2 и p53, но степень их выраженности коррелировала с дозой облучения и говорит об изменении пролиферативно-аппоптотического баланса, наиболее показательными которые были в группах облучения меньшей (2 Гр), пограничной (8 Гр) и наибольшей (12 Гр) дозами (табл. 1, рис. 1).

Ki-67-положительная реакция в половых клетках, преимущественно в единичных сперматогониях в группе облучения 2 Гр была в 1,5 раза меньше чем в образцах контроля, а также прослеживалась тенденция к уменьшению степени окрашивания в зависимости от дозы. В микропрепаратах наблюдали умеренное маркирование количества гамет в группах облучения, особенно в 8 Гр и 12 Гр интенсивность окрашивания увеличилась в 2,0 и более раза по сравнению с контрольной группой. Максимальную интенсивность иммуномечения демонстрировали первичные сперматоциты.

Экспрессия белка готовности к апоптозу p53 в сперматогенном эпителии опытных групп (преимущественно сперматогонии и спермато-

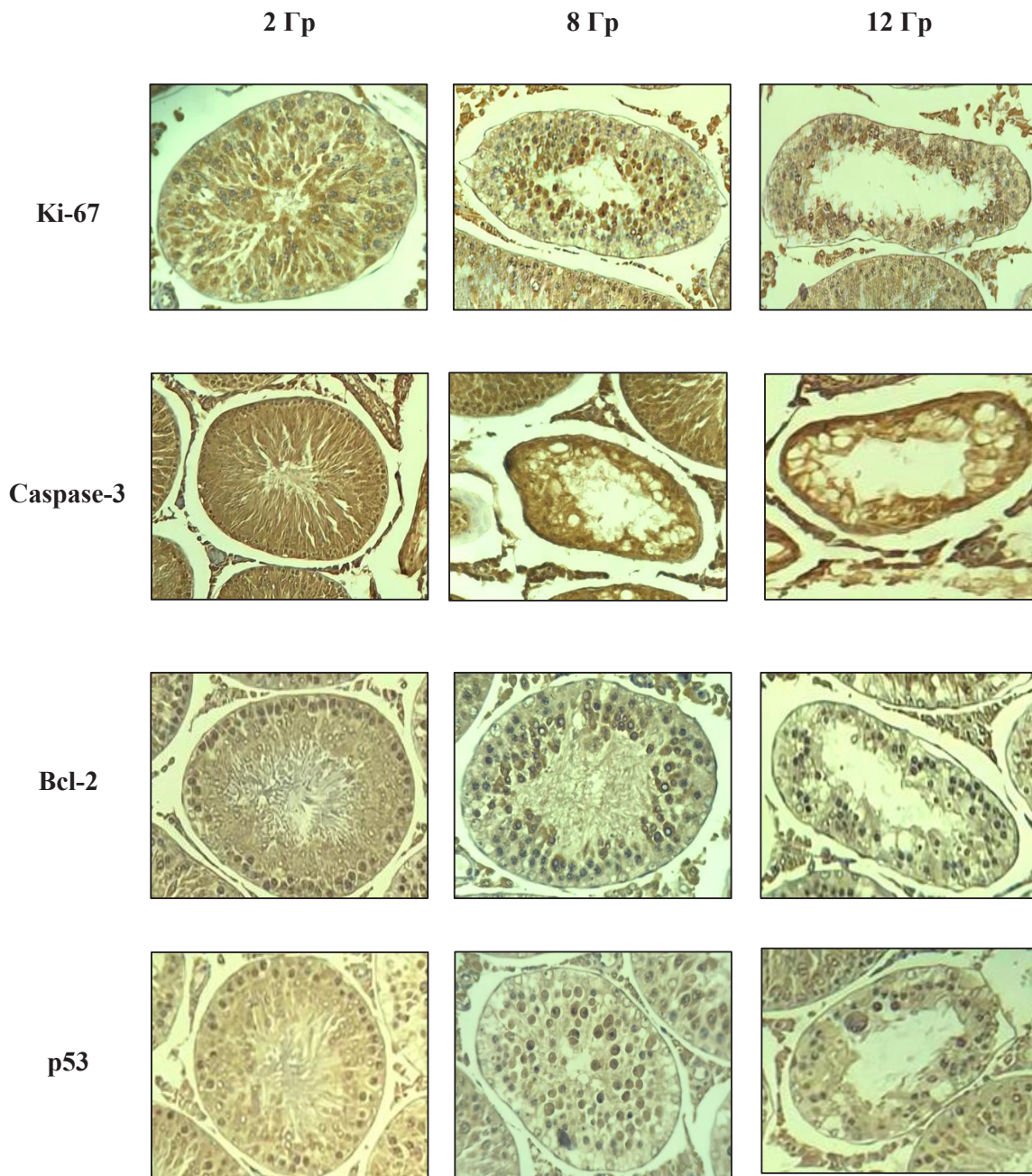
Таблица 1

Сравнительная характеристика доли ИГХ-позитивных клеток в семенных канальцах после облучения электронами (% , при  $p < 0.05$ ).

Доза облучения, Гр	Ki-67	caspase-3	Bcl-2	p53
Контроль	$49.0 \pm 0.2$	$20.0 \pm 0.3$	$41.0 \pm 0.1$	$15.0 \pm 0.5$
2	$18.0 \pm 0.1^a$	$25.0 \pm 0.1^a$	$27.0 \pm 0.7^a$	$33.0 \pm 0.1^a$
8	$8.0 \pm 0.3^b$	$55.0 \pm 0.2^b$	$15.5 \pm 0.7^b$	$67.0 \pm 0.2^b$
12	$2.0 \pm 0.1^c$	$74.0 \pm 0.1^c$	$7.0 \pm 0.2^c$	$83.0 \pm 0.1^c$

Примечание: <sup>a</sup> $p < 0.05$  (2 Гр и контроль), <sup>b</sup> $p < 0.05$  (8 Гр и контроль), <sup>c</sup> $p < 0.05$  (12 Гр и контроль)





**Рис.1. Семенные каналцы крыс при различных дозах облучения. Иммуногистохимические реакции, докрасивание - гематоксилином, увелич. х400.**

циты I-го типа) была в 2,0 – 5,0 раз выше, чем в контрольной. В то же время, маркер антиапоптотической активности (Bcl-2) показал слабое окрашивание половых клеток в микропрепаратах семенников разных доз облучения, в том числе и семенных шаров в отличие от образцов I-ой группы.

Также мы наблюдали умеренное увеличение количества гамет, проявляющих положительную ИГХ-реакцию на каспазу-3, в группах облучения, интенсивность которой повышалась в зависимости от дозы, что свидетельствует об уходе данных клеток в апоптоз.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Настоящее экспериментальное исследование посвящено изучению влияния локального облучения электронами на жизненный цикл мужских гамет в эксперименте на семенниках крыс, для дальнейшей разработки способов защиты данного радиочувствительного органа.

Согласно обнаруженной морфологической картине после локального облучения импульсным ускорителем электронов «NOVAC-11» при дозах 2 Гр, 8 Гр и 12 Гр через неделю происходит снижение количество половых клеток,

преимущественно сперматогоний, что частично согласуется с данными других авторов [11; 12; 13]. В своем исследовании Marzban et al. наблюдали уменьшение количества половых клеток и истончение сперматогенного эпителия, а также снижение количества клеток Лейдига при общем облучении 2 Гр [14]. В тоже время, нами были обнаружены пикнотические изменения в сперматогониях и первичных сперматоцитах, стойкие явления в кровеносных сосудах и отек интерстициальной ткани, которые усиливались с повышением дозы. Механизмы воздействия ионизирующего излучения на ткани еще до конца не изучены, многие исследователи говорят о превалирующей роли окислительного стресса как причину перекисного окисления липидов сопровождаемого повышением уровня специфического маркера – МДА [15], что было показано, в частности, при облучении всего тела в дозе 5 Гр [16].

При иммуногистохимической оценки маркеров пролиферации и апоптоза, а также про- и антиапоптотических факторов клеточного цикла гамет было выявлено увеличение активности каспазы-3, демонстрирующее прямую зависимость с повышением дозы облучения по сравнению с контрольной группой. Каспаза-3 – важнейший белок терминальной стадии апоптоза, количество которого возрастает после воздействия ионизирующего излучения [15; 17], а белок Ki-67 является маркером размножения клеток, уровень которого понижается и приводит к регрессу пролиферации, что было обнаружено в нашем исследовании, особенно на сублетальных дозах [10]. Более вероятно, что воздействие ионизирующего излучения на половые клетки самцов приводит к активации внутреннего пути апоптоза и увеличению экспрессии апоптотических белков в каскаде клеточной гибели, что отчетливо прослеживается в группе при дозе 12 Гр. Минимизация неблагоприятных исходов усиливающегося окислительного стресса при апоптозе является одним из преимуществ локального облучения в отличие от общего радиоактивного воздействия.

Исходя из полученных данных, для снижения рисков развития и профилактики нарушений сперматогенеза, после облучения в онкологической практике, необходима разработка лекарственных веществ или других методов, обладающих антиапоптотическим, антиоксидантным или комбинаторным действием.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В семеннике однократное облучение электронами (импульсный ускоритель «NOVAC-11») приводит к резкому сдвигу пролиферативно-

апоптотического баланса в сторону гибели половых клеток, в первую очередь сперматогоний, о чем свидетельствуют значения ИГХ-реакций: увеличение уровня терминальной фазы апоптоза – каспазы-3 и снижение маркера пролиферации Ki-67 на фоне снижения степени маркирования антиапоптотического Bcl-2 и повышения проапоптотического p53 факторов. При этом глубина и степень данных изменений усиливается с повышением дозы (2 Гр, 8 Гр, 12 Гр).

### ЛИТЕРАТУРА / REFERENCE

1. Kumar N., Singh A. K. Trends of male factor infertility, an important cause of infertility: A review of literature. *J Hum Reprod Sci.* 2015;8(4):191-196. doi:10.4103/0974-1208.170370.
2. Chalyi M. E., Akhvediani N. D., Kharchilava R. R. Male infertility. *Urologiia.* 2017;(S2):4-19. (In Russ.).
3. Demyashkin G. A. Apoptosis in seminiferous tubules of human in normal and in idiopathic infertility. *Tsitologiya.* 2018;60:208-218. (In Russ.) doi:10.31116/tsitol.2018.03.07.
4. Dehghani F., Sotoude N., Bordbar H., Panjeshahin M., Karbalay-Doust S. The use of platelet-rich plasma (PRP) to improve structural impairment of rat testis induced by busulfan, *Platelets*, 2018. doi: 10.1080/09537104.2018.1478400.
5. Khan S., Adhikari J. S., Rizvi M. A. Radioprotective potential of melatonin against 60Co  $\gamma$ -ray-induced testicular injury in male C57BL/6 mice. *J Biomed Sci.* 2015;22: 61. doi:10.1186/s12929-015-0156-9.
6. Dergilev A. A., Palyga G. F., Chibisova O. F., Ivanov V. L., Panfilova V. V., Zhavoronkov L.P. Radiation and spermatogenesis: experimental estimation of radiation effect at doses below castrate level on ontogenesis. *Radiation and Risk.* 2012;21(4):51–60.
7. Gao S., Zhao Z., Wu R., Zeng Y., Zhang Z., Miao J., Yuan . Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation improves radiation-induced heart injury through DNA damage repair in rat model. *Radiat Environ Biophys.* 2017;56:63–77.
8. Ghobadi A., Shirazi A., Najafi M., Kahkesh M. H., Rezapoor S. Melatonin ameliorates radiation-induced oxidative stress at targeted and nontargeted lung tissue. *J Med Phys.* 2017;42:241–244.
9. Bing S. J., Kim M. J., Ahn G., Im J., Kim D. S., Ha D., Cho J., Kim A., Jee Y. Acidic polysaccharide of Panax ginseng regulates the mitochondria/caspase-dependent apoptotic pathway in radiation-induced damage to the jejunum in mice. *Acta Histochem.* 2014;116:514–521.
10. Demyashkin G. A., Proliferation and apoptosis of male germ cells in the seminiferous epithelium in normal and nonobstructive

azoospermia. *Crimea Journal of Experimental and Clinical Medicine* 2016;7(2):19-32. (In Russ.).

11. Naeimi R. A., Talebpour Amiri F., Khalatbary A. R., Ghasemi A., Zargari M., Ghesemi M., Hosseinimehr S. J. Atorvastatin mitigates testicular injuries induced by ionizing radiation in mice. *Reprod Toxicol.* 2017;72:115–121.

12. Ji H. J., Wang D. M., Wu Y. P. Wuzi Yanzong pill, a Chinese polyherbal formula, alleviates testicular damage in mice induced by ionizing radiation. *BMC Complement Altern Med.* 2016;16:1–7.

13. Ahmed M. M., Ibrahim Z. S., Alkafafy M., El-Shazly S. A. L-Carnitine protects against testicular dysfunction caused by gamma irradiation in mice. *Acta Histochem.* 2014;116:1046–1055.

14. Geramizadeh B., Marzban M., Churg A. (2016). Role of immunohistochemistry in the

diagnosis of solitary fibrous tumor, a review. *Iran J Pathol.* 11:195–203

15. Topcu A., Mercantepe F., Rakici S., Tumkaya L., Avni H. An investigation of the effects of N-acetylcysteine on radiotherapy-induced testicular injury in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol;* 2018. doi:10.1007/s00210-018-1581-6.

16. Aktoz T., Caloglu M., Yurut-Caloglu Vet. Histopathological and biochemical comparisons of the protective effects of amifostine and l-carnitine against radiation-induced acute testicular toxicity in rats. *Andrologia.* 2017;49:1–7.

17. El-Missiry M. A., Othman A.I., El-Sawy M. R., Lebede M. F. Neuroprotective effect of epigallocatechin-3 gallate (EGCG) on radiation-induced damage and apoptosis in the rat hippocampus. *Int J Radiat Biol.* 2018;0:1–27.

## ВЛИЯНИЕ ГИБРИДНЫХ ОЛОВООРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ В МАКСИМАЛЬНО ЭФФЕКТИВНОЙ ДОЗЕ НА РОСТ И АКТИВНОСТЬ МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ МЕЛАНОМЫ B16 У МЫШЕЙ ЛИНИИ C57BL/6

Додохова М. А.<sup>1</sup>, Котиева И. М.<sup>2</sup>, Сафроненко А. В.<sup>3</sup>, Алхусейн-Кулягинова М. С.<sup>4</sup>,

Милаева Е. Р.<sup>5</sup>, Шпаковский Д. Б.<sup>5</sup>, Терехов А. Ю.<sup>6</sup>, Сергеева Е. О.<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Кафедра биомедицины и психофизиологии, <sup>2</sup>кафедра патологической физиологии, <sup>3</sup>кафедра фармакологии и клинической фармакологии, <sup>4</sup>кафедра химии ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России, 344022, Нахичеванский пер., 29, Ростов-на-Дону, Россия

<sup>5</sup>Кафедра медицинской химии и тонкого органического синтеза, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», Химический факультет, 119991, Ленинские горы, 1, стр. 3, г. Москва, Россия

<sup>6</sup>Кафедра патологии, Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России, 357501, ул. Калинина, 11, Пятигорск, Россия

**Для корреспонденции:** Додохова Маргарита Авдеевна, кандидат медицинских наук, доцент, доцент кафедры биомедицины и психофизиологии, ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России, e-mail: dodokhova@mail.ru.

**For correspondence:** Dodokhova Margarita Avdeevna, candidate of Medical Sciences, Associate Professor of the Department of Biomedicine and Psychophysiology, Rostov State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, e-mail: dodokhova@mail.ru.

### Information about authors:

**Dodokhova M. A.**, <https://orcid.org/0000-0003-3104-827X>

**Kotieva I. M.**, <https://orcid.org/0000-0002-2796-9466>

**Safronenko A. V.**, <https://orcid.org/0000-0003-4625-6186>

**Alkhuseyn-Kulyaginova M. S.**, <https://orcid.org/0000-0001-5123-5289>

**Milaeva E. R.**, <https://orcid.org/0000-0002-5489-3866>

**Shpakovsky D. B.**, <https://orcid.org/0000-0002-7824-3382>

**Terekhov A. Yu.**, <https://orcid.org/0000-0002-7781-362X>

**Sergeeva E. O.**, <https://orcid.org/0000-0001-7496-3967>

### РЕЗЮМЕ

Метастазирование – сложный многокомпонентный процесс, во многом определяющий влияние опухолевого процесса на организм. Изучение показателей изменения активности метастазирования под действием новых противоопухолевых агентов – одна из важнейших задач экспериментальной фармакологии и онкологии. Влияние оловоорганических соединений (ООС) бис(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенилтиолат) диметилолова (Ме3) и (3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенилтиолат) трифенилолова (Ме5) исследовано в максимально эффективных суммарных дозах 375 мг/кг и 250 мг/кг соответственно. Исследование проведено на модели спонтанно метастазирующей перевиваемой опухоли меланомы B16. Оба соединения проявили высокий антиметастатический эффект, более выраженный для диалкилорганического соединения.

**Ключевые слова:** оловоорганические соединения, метастазирование, противоопухолевые средства, меланома B16, исследования in vivo.

### EFFECT OF HYBRID ORGANOTIN COMPOUNDS AT THE MAXIMUM EFFECTIVE DOSE ON THE GROWTH AND METASTASIS ACTIVITY OF B16 MELANOMA IN C57BL/6 MICE

**Dodokhova M. A.<sup>1</sup>, Kotieva I. M.<sup>1</sup>, Safronenko A. V.<sup>1</sup>, Alkhuseyn-Kulyaginova M. S.<sup>1</sup>, Milaeva E. R.<sup>2</sup>, Shpakovsky D. B.<sup>2</sup>, Terekhov A. Yu.<sup>3</sup>, Sergeeva E. O.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russia

<sup>2</sup>Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry, Moscow, Russia

<sup>3</sup>Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute-branch of Volgograd State Medical University, Pyatigorsk, Russia

### SUMMARY

Metastasis is a complex multicomponent process that largely determines the effect of the tumor process on the body. The study of indicators of changes in the activity of metastasis under the influence of new antitumor agents is one of the most important tasks of experimental pharmacology and oncology. The effect of the organotin compounds (OOS) bis (3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenylthiolate) dimethylolol (Me3) and (3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenylthiolate) triphenylolol (Me5) was studied at the maximum effective total doses of 375 mg/kg and 250 mg/kg, respectively, on a

model of a spontaneously metastasizing transferable tumor melanoma B16. Both compounds showed a high antimetastatic effect, more pronounced for the dialkyl organic compound.

**Key words:** organotin compounds, metastasis, antitumor agents, B16 melanoma, in vivo studies.

Большие успехи в диагностике и лечения злокачественных новообразований в России приводят к увеличению продолжительности жизни пациентов, а также росту индексов накопления контингента больных со злокачественными новообразованиями различной локализации. Меланома является очень агрессивным видом опухолей [1; 2]. Метастазы, очаги малигнизации, развивающиеся на расстоянии от первичной опухоли, являются причиной смерти 90% пациентов, умерших от меланомы кожи [3]. В связи с этим активность процесса метастазирования является одним из основных критериев выживаемости пациентов всех групп диспансерного наблюдения.

Метастазирование – это сложный многостадийный процесс, который характеризуется миграцией злокачественных клеток из области первичного очага в отдаленные органы и ткани. На каждом этапе метастазирования происходит трансформация злокачественных клеток и их адаптация к новой среде. Межклеточное пространство и его морфофункциональное состояние играет в этой связи немаловажную роль.

В качестве противоопухолевых и антиметастатических агентов нами предложены гибридные оловоорганические соединения (ООС), которые имеют два компонента в составе молекулы: цитотоксический, содержащий олово (Sn IV) и протекторный, сложный радикал 2,6-дитретбутилфенил. Уникальность этой структуры заключается в сочетании двойственных свойств в пределах одной молекулы. Протекторный эффект доказан нами в предыдущих исследованиях и заключается в снижении показателей общей токсичности по сравнению с соединениями-аналогами более простой структуры, достаточно низкой кардио- и гепатотоксичности [4; 5].

Фрагмент 2,6-дитретбутилфенола, безусловно, обладает антиоксидантными свойствами [6; 7], что может внести дополнительный механизм реализации цитотоксического эффекта на уровне как первичного очага, так и процесса метастазирования. Данные литературы о влиянии антиоксидантов различной химической структуры на процесс роста злокачественных новообразований и активность метастатического поражения очень противоречивы: от полного или частичного ингибирования до активации роста и развития опухолей на всех стадиях, включая и процесс диссеминации злокачественных клеток [8, 9].

На модели перевиваемой опухоли со спонтанным метастазированием меланоме В16 был произведено скрининговое исследование, когда гибридные ООС были введены животным в широком диапазоне доз. Результатом проведенной работы стало нахождение максимально эффективных доз гибридных ООС для подавления опухолевого процесса. Углубленное изучение показателей роста меланомы В16 и активности метастазирования при введении данных доз ООС представлено в данной статье.

Целью нашего исследования явилось изучение влияния максимально эффективных суммарных доз гибридных ООС: бис(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенилтиолат) диметиллолова (Ме3) в дозе 375 мг/кг и 3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенилтиолат) трифениллолова (Ме5) в дозе 250 мг/кг на рост первичного очага и активность процесса метастазирования меланомы В16 у мышей линии С57В1/6.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование было выполнено на 36 мышах - самках линии С57В1/6 8 недельного возраста массой 21-22 гр. Животные получены из питомника НИЦ «Курчатовский институт» - «ПЛЖ «Рапполово», после истечения карантинного наблюдения (14 суток), животные были стандартизированы по возрасту, полу и весу. Поддержание штамма и перевивка меланомы В16 подкожно в правую подмышечную область были выполнены по общепринятым методикам [10, 11]. Штамм получен из банка опухолевых материалов Научно-исследовательского института экспериментальной диагностики и терапии опухолей РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. Через 48 часов после перевивки меланомы В16 мышам-самкам линии С57В1/6 животные были рандомизированы с помощью таблицы случайных чисел. Соединения Ме3 и Ме5 вводили 1 раз в сутки в течение 5 дней, внутривентриально [12].

Животные были разделены на 3 группы: I – пятикратное внутривентриальное введение Ме3 в разовой дозе (РД) 75 мг/кг (n=12); II – пятикратное внутривентриальное введение Ме5 в РД 50 мг/кг (n=12); III – контрольная группа - 1% раствор желатина вводился в эквивалентных режимах и объемах (n=12). Все исследования выполнялись в соответствии с Международными и Российскими требованиями проведения научных исследований на лабораторных животных.

Через 18 суток после введения субстанций была произведена эктаназия путем декапитации на гильотине, патологоанатомическое вскрытие производилось по известной методике [13].

В качестве критериев оценки эффективности противоопухолевой и антиметастатической терапии использовали следующие показатели:

1. среднее время выхода первых опухолевых узелков, СВ, дни;

2. процент торможения роста опухоли по массе

ТРО, % =  $(M_k - M_o) \times 100\% / M_k$ , где  $M_k$  и  $M_o$  – средняя масса опухоли в контрольной и опытной группе;

3. частота метастазирования опухоли

ЧМ, % =  $KЖ_{метаст} \times 100\% / KЖ_{общ}$ , где КЖ метаст – количество животных в группе с выявленным метастазированием в легкие, КЖ всего – количество животных в группе;

4. индекс ингибирования метастазирования

ИИМ, % =  $((ЧМ_k \times КМ_k) - (ЧМ_o \times КМ_o)) \times 100\% / (ЧМ_k \times КМ_k)$ , где  $ЧМ_k$  и  $ЧМ_o$  – частота метастазирования в легкие у животных контрольной и опытных групп,  $КМ_k$  и  $КМ_o$  – среднее число метастазов в легких у животных контрольной и опытной групп;

5. степень поражения легких по методике D. Tarin и J.E. Price. Критериями активности метастатического поражения являются количество метастазов и их диаметр: 0 степень – отсутствие метастазов, 1 степень – меньше 10 шт, диаметр

не превышает 1 мм, 2 степень – от 10 до 30 шт, диаметр больше 1 мм, 3 степень – больше 30 шт, без слияния, 4 степень – до 100шт.

Результаты исследования выражались в виде средней величины показателя  $\pm$  ошибка средней величины. Совокупность показателей в группе проверялась на нормальность распределения посредством теста Андерсона-Дарлинга. Распределение показателей подчиняется нормальному закону распределения. Оценку различий показателей в опытной группе по отношению к контрольной оценивали с помощью t-критерия Стьюдента в программе Statistica 10 и считали статистически значимыми при вероятности выше 95%.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В предварительном скрининговом исследовании в широком диапазоне доз Me3 и Me5 были выявлены максимально эффективные суммарные дозы исследуемых субстанций 375 мг/кг и 250 мг/кг соответственно, которые отображены в таблице 1.

При развернутой оценке опухолевого роста и активности метастазирования установлено, что при введении Me3 и Me5 достоверно увеличивается среднее время выхода первых опухолевых узелков на первом этапе развития процесса. При подкожной перевивке меланомы B16 опухоль имеет солидный рост и при каждодневной пальпации обнаружена значительная задержка ее роста.

Таблица 1

Влияние Me3 и Me5 на рост первичного очага Меланомы B16 и активность метастазирования (M $\pm$ m, p)

Показатели \ Группы	I n=12 (опытная – Me3)	II n=12 (опытная – Me5)	III n=12 (контрольная - 1% раствор желатина)
СВ, дни	6,25 $\pm$ 0,6 p<0,05	8,2 $\pm$ 0,9 p<0,05	5,6 $\pm$ 0,6
ТРО, %	27 p<0,05	22,9 p<0,05	-
ЧМ, %	100	100	100
ИИМ, %	54 p<0,05	36 p<0,05	-
Степень метастазирования по D. Tarin и J.E. Price	100% 1 степень	100% 1 степень	16,7% 1 степень, 83,3% 2 степень

Через 18 суток после перевивки у всех животных наблюдалось метастазирование в легкие, степень данного процесса была различной, металлоорганические соединения олова Me3 и Me5 снижали метастазирование, уменьшая количество вторичных очагов и их диаметр. 2 степень, диагностированная по методике D. Tarin и J.E. Price, превалирующая у животных контрольной группы (среднее количество метастатических очагов 10,8 $\pm$ 1,3шт на 1 мыш, снизилась. У

животных, получивших ООС, метастатическое поражение легких 1 степени (среднее количество метастатических очагов при введении Me3 и Me5 5,0 $\pm$ 0,7шт и 6,9  $\pm$ 0,9шт на 1 мыш соответственно).

Влияние испытуемых соединений на массу первичного очага показало, что снижение достоверно выражено (27% и 22,9%) по отношению к значениям в контрольной группе, но между опытными группами нет достоверных отличий.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Реализация противоопухолевого и антиметастатического эффектов гибридных ООС была доказана на модели перевиваемой опухоли мышей со спонтанным метастазированием. Нужно отметить, что введение Me3 и Me5 началось через 48 часов после перевивки опухолевой массы, что дает возможность говорить о профилактике метастазирования, и в меньшей степени, о лечении вторичных очагов при диссеминации процесса. Время выхода узелков первичного очага достоверно увеличивается, степень метастатической диссеминации снижается. На наш взгляд, это связано с изменением функционального состояния окружающих тканей. Оба исследуемых соединения имеют в составе молекулы антиоксидантный фрагмент, который может играть существенную роль в изменении прооксидантно - антиоксидантного и кислотно-основного статуса клетки. Влияние антиоксидантов на рост и развитие опухолевого процесса является предметом дискуссий в различных исследованиях. Антиоксиданты способны защищать не только нормальные клетки от альтерирующего воздействия свободных радикалов, но и опухолевые клетки, тем самым поддерживая их выживаемость и рост [14]. То есть с одной стороны, за счет снижения активных форм кислорода, избыточно образующихся в опухолевой клетке при гипоксии, антиоксиданты могут улучшать метаболические характеристики тканей, в которые возможно метастазирование, а также сами являться повреждающими агентами для злокачественных клеток [15; 16]. С другой стороны, возможна активация процесса опухолевого роста и трансформации. Реализация про- и /или антиоксидантного потенциала Me3 и Me5, на наш взгляд, является основой противоопухолевого и антиметастатического действия гибридных ООС.

Раскрытие механизма гибридных ООС является предметом наших дальнейших исследований.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования установлено, что ООС Me3 и Me5, содержащие фрагмент 2,6-ди-трет-бутилфенола, вызывали умеренный противоопухолевый и выраженный антиметастатический эффект при введении в суммарной дозе 375 мг/кг и 250 мг/кг соответственно.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors have no conflict of interests to declare.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Каприн А. Д., Мацкеплишвили С. Т., Потиевская В. И., Поповкина О. Е., Болотина Л. В., Шкляева А. В., Полуэктова М.В. Сердечно-сосудистые заболевания у онкологических больных. Онкология. Журнал им. П.А. Герцена. 2019;8(2):139-147. doi: /10.17116/onkolog20198021139
2. Состояние онкологической помощи населению России в 2019 году. Под ред. Каприна А. Д., Старинского В. В., Шахзадовой А. О. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена-филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России; 2020.
3. Deniffel D., Sauter A., Dangelmaier J., Fingerle A., Rummeny E. J., Pfeiffer D. Differentiating intrapulmonary metastases from different primary tumors via quantitative dual-energy CT based iodine concentration and conventional CT attenuation. Eur. J. Radiol. 2019; 111:6-13. doi: 10.1016/j.ejrad.2018.12.015
4. Додохова М. А., Сафроненко А. В., Котиева И. М., Комарова Е. Ф., Милаева Е. Р., Шаповский Д. Б., Алхусейн-Кулягинова М. С. Оценка безопасности применения оловоорганических соединений как перспективных кандидатов в противоопухолевые лекарственные средства. Евразийский онкологический журнал. 2021;9(S1):525-526.
5. Додохова М. А., Котиева И. М., Сафроненко А. В., Алхусейн-Кулягинова М. С., Милаева Е. Р., Шаповский Д. Б., Макаренко Ю. М., Терехов А. Ю., Сергеева Е. О. Оценка кардиотоксических побочных явлений при введении оловоорганических соединений на доклиническом этапе исследования. Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. 2021;11(2):11-18. DOI:10.37279/2224-6444-2021-11-2-11-18.
6. Milaeva E.R., Tyurin V.Yu., Gracheva Y.A., Dodochova M.A., Pustovalova L.M., Chernyshev V.N. Protective effect of meso-tetrakis-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl) porphyrin on the in vivo impact of trimethyltin chloride on the antioxidative defense system. Bioinorg Chem Appl. 2006;2006:64927. doi: 10.1155/BCA/2006/64927.
7. Грачева Ю. А., Додохова М. А., Милаева Е. Р. Изучение in vivo активности порфирина с 2,6-ди-трет-бутилфенольными группами в снижении токсического действия хлорида триметиллолова XIX Менделеевский съезд по общей и прикладной химии. Тезисы докладов. 25-30 сентября, 2011; Волгоград:495. Доступно по: [https://www.studmed.ru/xix-mendeleevskiy-sezd-po-obschey-i-prikladnoy-himii-volgograd-25-30-sentyabrya-2011-tezisy-dokladov\\_a0f90de0fe1.html](https://www.studmed.ru/xix-mendeleevskiy-sezd-po-obschey-i-prikladnoy-himii-volgograd-25-30-sentyabrya-2011-tezisy-dokladov_a0f90de0fe1.html). Ссылка активна на 25.02.2020.
8. Вострикова С. М., Гринев А. Б., Гогвадзе В. Г. Активные формы кислорода и антиоксиданты в канцерогенезе и терапии опухолей. Биохимия. 2020;85(10):1474-1488. doi: 10.31857/S0320972520100139.
9. Зенков Н. К., Кожин П. М., Вчерашняя А. В., Мартинович Г. Г., Кандалинцева Н. В., Меньщикова

- Е. Б. Особенности редокс-регуляции в опухолевых клетках. Сибирский научный медицинский журнал. 2019;39(2):11-26. doi: 10.15372/SSMJ20190202.
10. Кит О. И., Котиева И. М., Франциянц Е. М., Каплиева И. В., Трепитаки Л. К., Бандовкина В. А., Нескубина И. В., Сурикова Е. И., Черярина Н. Д., Погорелова Ю. А., Немашкалова Л. А. Влияние хронической нейропатической боли на течение злокачественного процесса меланомы B16/F10 у самцов мышей. Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Серия: Естественные науки. 2019;1(201):106-111. doi: 10.23683/0321-3005-2019-1-106-111.
11. Котиева И. М., Кит О. И., Франциянц Е. М., Бандовкина В. А., Каплиева И. В., Трепитаки Л. К., Черярина Н. Д., Погорелова Ю. А., Ближян М. В. Влияние хронической боли на уровень половых гормонов, пролактина и гонадотропных гормонов в сыворотке крови и патологически измененной коже у самок мышей в динамике роста злокачественной меланомы Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Серия: Естественные науки. 2018;2(198):106-116. doi: 10.23683/0321-3005-2018-2-106-116.
12. Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США. Под ред. З. П. Софьиной, А. Б. Сыркина (СССР), А. Голдина, А. Кляйна (США). М.: Медицина; 1980.
13. Коптяева К. Е., Мужикян А. А., Гущин Я. А., Беляева Е. В., Макарова М. Н., Макаров В. Г. Методика вскрытия и извлечения органов лабораторных животных. Сообщение 2: мышь. Лабораторные животные для научных исследований. 2018; 4. doi: 10.29296/2618723X-2018-04-05
14. Пузаков К. К., Дурнова Н. А., Рыженкова И. Г. Современные представления о влиянии экзогенных антиоксидантов на рост злокачественных опухолей. Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2019;17(2):29-33. doi: 10.7816/RCF17229-33.
15. Гайнутдинов П. И., Кожин П. М., Чечушков А. В., Мартинович Г. Г., Хольшин С. В., Кандалинцева Н. В., Зенков Н. К., Меньщикова Е. Б. Обратная зависимость между антиоксидантной активностью синтетических монофенолов структурно взаимосвязанного ряда и их токсичностью в отношении опухолевых клеток. Сибирский научный медицинский журнал. 2018;38(1):22-31. doi: 10.15372/SSMJ20180104.
16. Меньщикова Е. Б., Чечушков А. В., Кожин П. М., Хольшин С. В., Кандалинцева Н. В., Мартинович Г. Г., Зенков Н. К. Синтетические монофенольные антиоксиданты активируют аутофагию в опухолевых клетках: зависимость от структуры и концентрации. Вестник Волгоградского государственного университета. Серия 11: Естественные науки. 2018;8(1):53-57. doi: 10.15688/jvolsu11.2018.1.10.
- M. V. Cardiovascular diseases in cancer patients. *Onkologiya. Zhurnal im. P.A. Gertsena*. 2019;8(2):139-147. (In Russ.). doi:10.17116/onkolog20198021139.
2. Sostoyanie onkologicheskoi pomoshchi naseleniyu Rossii v 2019 godu. Pod red. Kaprina A. D., Starinskogo V. V., Shakhzadovoi A. O. M.: MNI OI im. P.A. Gertsena-filial FGBU «NMITs radiologii» Minzdrava Rossii; 2020. (In Russ.).
3. Deniffel D., Sauter A., Dangelmaier J., Fingerle A., Rummeny E.J., Pfeiffer D. Differentiating intrapulmonary metastases from different primary tumors via quantitative dual-energy CT based iodine concentration and conventional CT attenuation. *Eur. J. Radiol.* 2019;111:6-13. doi: 10.1016/j.ejrad.2018.12.015.
4. Dodokhova M. A., Safronenko A.V., Kotieva I. M., Komarova E. F., Milaeva E. R., Shpakovskii D. B., Alkhusein-Kulyaginova M.S. Assessment of the safety of the use of organotin compounds as promising candidates for antitumor drugs. *Evraziiskii onkologicheskii zhurnal*. 2021;9(S1):525-526. (In Russ.).
5. Dodokhova M. A., Kotieva I. M., Safronenko A. V., Alkhuseyn-Kulyaginova M. S., Milaeva E. R., Shpakovsky D. B., Makarenko Yu. M., Terekhov A. Yu., Sergeeva E. O. Assessment of cardiotoxic side effects in the administration of organotin compounds at the preclinical stage of the study. *Krymskii zhurnal eksperimental'noi i klinicheskoi meditsiny*. 2021;11(2):11-18. (In Russ.). DOI:10.37279/2224-6444-2021-11-2-11-18.
6. Milaeva E. R., Tyurin V. Yu., Gracheva Y. A., Dodochova M. A., Pustovalova L. M., Chernyshev V. N. Protective effect of meso-tetrakis-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl) porphyrin on the in vivo impact of trimethyltin chloride on the antioxidative defense system. *Bioinorganic Chemistry and Applications*. 2006;2006:64927. doi:10.1155/BCA/2006/64927.
7. Gracheva Yu. A., Dodokhova M. A., Milaeva E. R. Izuchenie in vivo aktivnosti porfirinac 2,6-di-tert-butilfenol'nyimi gruppami v snizhenii toksicheskogo deistviya khlorida trimetilolova. XIX Mendeleevskii s'ezd po obshchei i prikladnoi khimii. Tezisy dokladov; 25-30 Sentyabrya, 2011; Volgograd: 495. (In Russ.). Available at: [https://www.studmed.ru/xix-mendeleevskiy-sezd-po-obshchey-i-prikladnoy-himii-volgograd-25-30-sentyabrya-2011-tezisy-dokladov\\_a0f90de0fe1.html](https://www.studmed.ru/xix-mendeleevskiy-sezd-po-obshchey-i-prikladnoy-himii-volgograd-25-30-sentyabrya-2011-tezisy-dokladov_a0f90de0fe1.html). Accessed February 25, 2020.
8. Vostrikova S. M., Gogvadze V. G., Grinev A. B. Reactive oxygen species and antioxidants in carcinogenesis and tumor therapy. *Biochemistry (Moscow)*. 2020;85(10):1254-1266. (In Russ.). doi: 10.31857/S0320972520100139.
9. Zerkov N. K., Kozhin P. M., Vcherashnyaya A. V., Martynovich G. G., Kandalintseva N. V., Menshchikova E. B. Features of redox regulation in tumor cells. *Sibirskii nauchnyi meditsinskii zhurnal*. 2019;39(2):11-26. (In Russ.). doi: 10.15372/SSMJ20190202.
10. Кит О. И., Котиева И. М., Франтсиянц Е. М., Каплиева И.В., Трепитаки Л. К., Бандовкина В. А., Нескубина

## REFERENCES

1. Kaprin A. D., Matskeplishvili S. T., Potievskaya V. I., Popovkina O. E., Bolotina L. V., Shklyayeva A. V., Poluektova



I. V., Surikova E. I., Cheryarina N. D., Pogorelova J. A., Nemashkalova L. A. Influence of chronic neuropathic pain on the course of malignant B16/F10 melanoma in male mice. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedenii. Severo-Kavkazskii region. Seriya: Estestvennye nauki.* 2019;1(201):106-111. (In Russ.). doi: 10.23683/0321-3005-2019-1-106-111.

11. Kotieva I. M., Kit O. I., Frantsiyants E. M., Bandovkina V. A., Kaplieva I. V., Trepitaki L. K., Cheryarina N. D., Pogorelova Y. A., Blikjan M. V. Effect of chronic pain on the level of sex hormones, prolactin and gonadotropins in serum and pathologically changed skin of female mice in dynamics of malignant melanoma growth. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedenii. Severo-Kavkazskii region. Seriya: Estestvennye nauki.* 2018. № 2 (198). С. 106-116. (In Russ.). doi:10.23683/0321-3005-2018-2-106-116.

12. Experimental evaluation of antitumor drugs in the USSR and the USA. Ed. Z. P. Sofina, A. B. Syrkin (USSR), A. Goldin, A. Klein (USA), M.: Medicine, 1980. (In Russ.).

13. Koptyaeva K. E., Muzhikyan A. A., Gushchin Ya. A., Belyaeva E. V., Makarova M. N., Makarov V. G. Technique Of Dissection And Extracting Organs Of

Laboratory Animals. Message 2: Mouse. *Laboratornye zhivotnye dlya nauchnykh issledovaniy* 2018;4. (In Russ.). doi: 10.29296/2618723X-2018-04-05.

14. Puzakov K. K., Durnova N. A., Ryzhenkova I. G. Modern ideas about the effect of exogenous antioxidants on the growth of malignant tumors. *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy.* 2019;17(2):29-33. (In Russ.). doi: 10.17816/RCF17229-33.

15. Gaynutdinov P. I., Kozhin P. M., Chechushkov A. V., Martinovich G. G., Kholshin S. V., Kandalintseva N. V., Zenkov N. K., Menshchikova E. B. Inverse relationship between the antioxidant activity of structurally related synthetic monophenols and their toxicity in tumor cells. *Sibirskii nauchnyi meditsinskii zhurnal.* 2018;38(1):22-31. (In Russ.). doi:10.15372/SSMJ20180104.

16. Menshchikova E. B., Chechushkov A. V., Kozhin P. M., Kholshin S. V. Activation of autophagy in tumor cells by synthetic monophenol antioxidants: dependence on structure and concentration. *Vestnik Volgogradskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya 11: Estestvennye nauki.* 2018;8(1):53-57. (In Russ.). doi: 10.15688/jvolsu11.2018.1.10.

## ЦИТОКИНЫ И МАРКЕРЫ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ У ЖЕНЩИН С АУТОИММУННЫМ ТИРЕОИДИТОМ В ДИНАМИКЕ ЛЕЧЕНИЯ

Игнатенко Т. С.<sup>1</sup>, Майлян Э. А.<sup>1</sup>, Капанадзе Г. Д.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ГОО ВПО «Донецкий национальный медицинский университет имени М. Горького» МЗ ДНР, 283003, пр. Ильича, 16, Донецк

<sup>2</sup>Институт неотложной и восстановительной хирургии им. В.К. Гусака, 283045, пр. Ленинский, 47, Донецк  
Для корреспонденции: Майлян Эдуард Апетнакович, доктор медицинских наук, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии, иммунологии и аллергологии Донецкого национального медицинского университета им. М. Горького, E-mail: mea095@yandex.ru

**For correspondence:** Maylyan Edward Apetnakovich, MD, Head of the Department of Microbiology, Virology, Immunology and Allergology of Donetsk National Medical University named after M. Gorky, e-mail: mea095@yandex.ru

### Information about authors:

Ignatenko T. S., <https://orcid.org/0000-0003-3611-1186>

Maylyan E. A., <http://orcid.org/0000-0003-2845-7750>

Kapanadze G. D., <https://orcid.org/0000-0002-1727-2809>

### РЕЗЮМЕ

Обследовано 147 женщин 31-47 лет с впервые выявленным АИТ и гипотиреозом в динамике заместительной терапии левотироксином натрия (до и спустя 6 месяцев). Контрольную группу составили 63 условно здоровые женщины, обследованные однократно. В сыворотке периферической крови определяли концентрации TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17A, RANKL, OPG, ТТГ и анти-ТПО.

Установлено, что исходно повышенные ( $p < 0,001$ ) значения IL-1 $\beta$  и IL-6 сохранились у пациентов и после заместительной терапии на более высоких уровнях, чем в контрольной группе ( $p < 0,001$ ). Выявленная в начале терапии тенденция к повышению уровней IL-10 ( $p = 0,056$ ) и IL-17A ( $p = 0,067$ ) к концу наблюдения была нивелирована ( $p > 0,05$ ). Значения TNF- $\alpha$  достоверно не отличались от показателей контрольной группы как исходно, так и через 6 месяцев ( $p = 0,166$  и  $p = 0,184$  соответственно). Оставались на уровне результатов здоровых женщин до и после лечения концентрации IL-4 ( $p = 0,376$  и  $p = 0,179$  соответственно), IL-8 ( $p = 0,102$  и  $p = 0,116$  соответственно) и OPG ( $p = 0,988$  и  $p = 0,661$  соответственно). Концентрации RANKL перед лечением были повышенными ( $p = 0,029$ ), но изменение уровней цитокина утратило достоверную значимость после терапии ( $p = 0,096$ ). Исходно сниженные значения индекса OPG/RANKL ( $p = 0,017$ ) также не отличались при повторном обследовании от показателей контрольной группы ( $p = 0,253$ ). Через 6 месяцев приема левотироксина женщинами с АИТ зарегистрировано достоверное ( $p < 0,001$ ) снижение исходно повышенных уровней ТТГ до значений, характерных для контрольной группы. При этом концентрации аутоиммунных анти-ТПО антител, которые были повышены в перед началом терапии ( $p < 0,001$ ), показали существенный прирост ( $p < 0,001$ ) в динамике лечения.

При обследовании женщин с АИТ и подтвержденным гипотиреозом установлено, что заместительная терапия левотироксином в течение 6 месяцев существенно не влияет на продукцию большинства исследованных цитокинов. Лечение обеспечивает снижение изначально увеличенных показателей ТТГ до значений контрольной группы, но сопровождается существенным приростом исходно повышенных анти-ТПО антител.

**Ключевые слова:** аутоиммунный тиреоидит, гипотиреоз, цитокины, тиреотропный гормон, антитела к тиреопероксидазе.

### CYTOKINES AND THYROID MARKERS IN BLOOD SERUM IN WOMEN WITH AUTOIMMUNE THYROIDITIS IN THE COURSE OF TREATMENT

Ignatenko G. A.<sup>1</sup>, Maylyan E. A.<sup>1</sup>, Kapanadze G. D.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>SEI HPE «M. Gorky Donetsk National Medical University» MH DPR, 283003, Ilyicha Ave., 16, Donetsk

<sup>2</sup>Institute of Urgent and Reconstructive Surgery named after Gusak V.K., 283045, Leninsky Ave., 47, Donetsk

### SUMMARY

The study involved 147 women aged 31-47 with newly diagnosed AIT and hypothyroidism in the dynamics of replacement therapy with levothyroxine (before and after 6 months). The control group consisted of 63 conditionally healthy women, examined once at the beginning of the study. In peripheral blood serum, the concentrations of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17A, RANKL, OPG, TSH and TPOAb were determined.

It was found that the initially increased values ( $p < 0,001$ ) of IL-1 $\beta$  and IL-6 remained in patients after substitution therapy at higher levels than in the control group ( $p < 0,001$ ). The tendency to an increase in the levels of IL-10 ( $p = 0,056$ ) and IL-17A ( $p = 0,067$ ) revealed at the beginning of therapy was leveled out ( $p > 0,05$ ) by the end of the observation. TNF- $\alpha$  values did not significantly differ from those of the control group both at baseline and after 6 months

( $p=0,166$  and  $p=0,184$ , respectively). The concentrations of IL-4 ( $p=0,376$  and  $p=0,179$ , respectively), IL-8 ( $p=0,102$  and  $p=0,116$ , respectively) and OPG ( $p=0,988$  and  $p=0,661$ , respectively) remained at the level of the results of healthy women before and after treatment. RANKL concentrations before treatment were elevated ( $p=0,029$ ), having lost their significant significance after therapy ( $p=0,096$ ). The initially decreased values of the OPG/RANKL index ( $p=0,017$ ) also did not differ on repeated examination from the indicators of the control group ( $p=0,253$ ). After 6 months of taking levothyroxine in women with AIT, a significant ( $p<0,001$ ) decrease in initially elevated TSH levels to the values characteristic of the control group was recorded against the background of a significant ( $p<0,001$ ) increase in the concentrations of initially elevated autoimmune antibodies ( $p<0,001$ ).

When examining women with AIT and confirmed hypothyroidism, it was found that replacement therapy with levothyroxine for 6 months did not significantly affect the production of most of the studied cytokines against the background of a decrease in the initially increased TSH values to the values of the control group and a significant increase in the initially increased TPOAb.

**Key words:** autoimmune thyroiditis, hypothyroidism, cytokines, thyroid stimulating hormone, thyroid peroxidase antibody.

## ВВЕДЕНИЕ

Актуальность аутоиммунного тиреоидита (АИТ) определяется его широкой распространенностью и серьезными последствиями для больных. Считается, что АИТ страдают от 6,0 до 11,0 % взрослого населения [1], а показатели ежегодной заболеваемости достигают 350 случаев на 100 000 для женского населения и 60 случаев на 100 000 для мужского [2]. АИТ обуславливает возникновение 70-80% всех случаев первичного гипотиреоза [3]. Более чем у 95% пациентов с манифестным гипотиреозом обнаруживаются диагностические концентрации антител к антигенным структурам ЩЖ [4].

В патогенезе АИТ ведущая роль отводится клеточным реакциям иммунитета [5]. Т-хелперы 1 типа (Th1) активируют цитотоксические лимфоциты и макрофаги в ткани ЩЖ, что ведет к непосредственной гибели фолликулярных клеток, а Th2 регулируют гуморальный иммунный ответ и способны избыточно стимулировать В-лимфоциты на синтез аутоантител [6]. Известно, что антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность при АИТ играет свою роль в апоптозе фолликулярных клеток ЩЖ [7]. Следует также указать, что антитела к тиреопероксидазе (анти-ТПО) способны индуцировать оксидативный стресс [8] и связывать комплемент [9]. Важную роль в развитии заболевания также отводят нарушениям количественного и функционального соотношения между клетками Th17, синтезирующими провоспалительные цитокины, и регуляторными Т-лимфоцитами (Treg), обладающими иммуносупрессивным эффектом [10].

Традиционное лечение АИТ направлено, в первую очередь, на устранение гипотиреоза, для чего используют заместительную гормональную терапию [11; 12]. Терапия левотироксином натрия, экзогенной формой тироксина, остается «золотым стандартом» лечения гипотиреоза на протяжении более 60 лет [13]. А целью ее является достижение эутиреоидного состояния и

предотвращение долгосрочных осложнений [3; 14]. Начальная доза левотироксина натрия в основном зависит от возраста пациента, наличия сопутствующей сердечно-сосудистой патологии, тяжести гипотиреоза [3]. Дозу титруют до тех пор, пока уровень тиреотропного гормона (ТТГ) не нормализуется [14; 15].

Следует отметить, что современные данные об особенностях динамики содержания цитокинов, антитиреоидных антител на фоне заместительной гормонотерапии АИТ с гипотиреозом в доступной литературе представлены единичными работами.

Цель работы – определить особенности динамики уровней TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17A, лиганда рецептора активатора ядерного фактора каппа- $\beta$  (RANKL), остеопротегерина (OPG), а также маркеров ЩЖ, характеризующих течение АИТ – ТТГ и анти-ТПО у женщин с АИТ.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Работу выполняли в ГОО ВПО «Донецкий Национальный медицинский университет им.М.Горького» и институте неотложной и восстановительной хирургии им. В.К. Гусака (г. Донецк). Для исследования в динамике лечения (до и спустя 6 месяцев) было отобрано 147 женщин в возрасте 31-47 лет с впервые выявленным АИТ и лабораторно доказанным гипотиреозом. Критериями исключения были наличие другой аутоиммунной и эндокринной патологии; сердечно-сосудистые заболевания; метаболические расстройства; хронические заболевания печени, почек, онкологические, гематологические и психические заболевания; хронические воспалительные заболевания; прием гормональных и иммуносупрессивных препаратов (глюкокортикоиды и др.).

Пациентам назначалась заместительная гормональная терапия в виде препарата левотироксина натрия. С целью оценки эффективности лечения и коррекции дозы лекарственного средства каждые 2 мес. у пациентов производи-

ли оценку уровней в сыворотке крови гормонов щитовидной железы и ТТГ.

Через 6 месяцев под наблюдением осталось 136 женщин. У всех пациентов подобранная доза левотироксина натрия (от 25 до 150 мг в сутки) обеспечивала целевые уровни ТТГ – в пределах референсных значений (0,23-3,40 мМЕ/л). Контрольную группу составили 63 условно здоровые женщины аналогичного возраста без заболевания ЩЖ, обследованные однократно.

Концентрацию TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17A, RANKL, OPG, ТТГ и анти-ТПО исследовали в сыворотке периферической крови, отобранной утром натощак, с помощью иммуноферментных тест систем производства «Вектор-Бест» (РФ), «eBiosciences» (США), «Biomedica Medizinprodukte» (Австрия), «Алкор-Био» (РФ). Определение вышеуказанных показателей выполняли перед инициацией лечения и спустя 6 месяцев приема левотироксина натрия.

В связи с тем, что характер распределения большинства исследуемых показателей был от-

личным от нормального, при статистическом анализе осуществляли расчет медианы (Me) и интерквартильного размаха [Q1; Q3]. Сравнение двух независимых выборок проводили с помощью теста Манна-Уитни, а двух связанных – Т-критерия Вилкоксона. Применяли пакет стандартных статистических программ «MedStat». Статистически значимыми отличия принимали при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Динамика содержания исследуемых цитокинов в сыворотке крови у женщин с АИТ и гипотиреозом на фоне заместительной гормональной терапии представлена в таблице 1. Установлено, что концентрации в сыворотке крови IL-1 $\beta$  и IL-6 существенно в динамике наблюдения не изменялись ( $p > 0,05$ ). Поэтому исходно повышенные их значения ( $p < 0,001$ ) сохранились у пациентов на более высоких уровнях, чем в контрольной группе, и через 6 месяцев заместительной терапии ( $p < 0,001$ ).

Таблица 1

**Показатели медианы и интерквартильного размаха [Q1; Q3] сывороточных уровней цитокинов у женщин с АИТ и гипотиреозом в динамике заместительной гормональной терапии**

Показатели	Здоровые женщины (n=63)	Женщины с АИТ и гипотиреозом	
		исходно (n=147)	через 6 месяцев (n=136)
TNF- $\alpha$ , пг/мл	0,0 [0,0; 1,1]	0,6 [0,0; 0,8]	0,4 [0,0; 0,9]
IL-1 $\beta$ , пг/мл	1,8 [1,2; 2,5]	3,5 [2,2; 4,9] ***	3,4 [2,4; 4,1] ***
IL-4, пг/мл	2,1 [1,6; 3,2]	2,9 [1,5; 3,1]	2,6 [1,8; 3,4]
IL-6, пг/мл	0,5 [0,1; 0,9]	2,5 [0,0; 6,0] ***	2,6 [1,0; 4,4] ***
IL-8, пг/мл	5,4 [3,6; 9,2]	6,6 [3,8; 10,0]	6,7 [4,2; 9,2]
IL-10, пг/мл	4,8 [2,9; 6,8]	5,6 [3,6; 7,4] *	5,5 [3,5; 7,3]
IL-17A, пг/мл	1,5 [0,8; 2,7]	2,7 [0,6; 3,2] *	2,0 [0,7; 3,0]
OPG, пг/мл	78,5 [66,1; 87,2]	76,7 [49,4; 107,6]	78,7 [56,9; 98,1]
RANKL, пг/мл	2,8 [2,2; 3,9]	3,4 [2,4; 4,9] **	3,3 [2,3; 4,8] *
OPG/RANKL	25,1 [17,7; 38,5]	21,8 [12,4; 34,0] **	23,4 [15,2; 35,1]

**Примечание:** \*, \*\*, \*\*\* –  $p < 0,1$ ,  $p < 0,05$  и  $p < 0,001$  соответственно в сравнении с показателями группы здоровых женщин.

Следует отметить, что выявленная в начале терапии близкая к статистической значимости тенденция к повышению сывороточных уровней IL-10 ( $p = 0,056$ ) и IL-17A ( $p = 0,067$ ) к концу наблюдения была нивелирована. При повторном обследовании значения вышеуказанных цитокинов у женщин с АИТ соответствовали контрольным данным ( $p > 0,05$ ).

Уровни TNF- $\alpha$  у больных достоверно не отличались от показателей женщин контрольной группы как при первом обследовании, так и по-

прошествии 6 месяцев ( $p = 0,166$  и  $p = 0,184$  соответственно). Оставались на уровне результатов здоровых женщин также концентрации IL-4 ( $p = 0,376$  до лечения;  $p = 0,179$  после лечения) и IL-8 ( $p = 0,102$  до лечения;  $p = 0,116$  после лечения).

Наряду с вышеизложенным, были установлены изменения в динамике лечения показателей цитокиновой системы RANK/RANKL/OPG. Уровни OPG не отличались от данных контрольной группы ни перед началом лечения, ни после 6 месяцев приема левотироксина натрия

( $p=0,988$  и  $p=0,661$  соответственно). Концентрации же RANKL перед инициацией лечения были повышенными ( $p=0,029$ ). Через 6 месяцев заместительной терапии ассоциация между АИТ и значениями RANKL утратила достоверную значимость ( $p=0,096$ ). Исходно сниженные значения индекса OPG/RANKL ( $p=0,017$ ) также уже не отличались при повторном обследовании от аналогичных показателей контрольной группы ( $p=0,253$ ).

Результаты исследования маркеров ЩЖ, характеризующих течение АИТ на фоне заместительной гормональной терапии, представлены в таблице 2. Через 6 месяцев приема левотироксина натрия у женщин с АИТ было зарегистрировано достоверное ( $p<0,001$ ) снижение исходно повышенных уровней ТТГ до значений, характерных контрольной группе. При

этом все 136 женщин с АИТ к концу наблюдения характеризовались сывороточными уровнями ТТГ в пределах от 0,24 до 3,09 мМЕ/л, а 78 из них (57,4%) имели показатели ТТГ ниже 2,00 мМЕ/л.

Динамика снижения в течение 6 месяцев уровней ТТГ вследствие получаемого лечения сочеталось у обследованных лиц с нарастанием концентраций в сыворотке крови аутоиммунных антител ( $p<0,001$ ). Так, если в момент установки диагноза патологии ЩЖ содержание в сыворотке крови анти-ТПО определялось на уровне 123,1 [102,0; 163,3] Ед/мл, то через 6 месяцев значения вышеуказанного показателя выросли в 1,8 раза, составив 225,5 [179,8; 299,6] Ед/мл. К концу наблюдения значения анти-ТПО у женщин с АИТ были достоверно выше как исходных, так и контрольных данных ( $p<0,001$ ).

Таблица 2

**Показатели медианы и интерквартильного размаха [Q1; Q3] сывороточных уровней ТТГ и анти-ТПО у женщин с АИТ и гипотиреозом в динамике заместительной гормональной терапии**

Показатели	Здоровые женщины (n=63)	Женщины с АИТ и гипотиреозом в динамике лечения	
		до (n=147)	через 6 месяцев (n=136)
ТТГ, мМЕ/л	1,73 [0,98; 2,38]	7,43 [5,76; 8,77] *	1,88 [1,02; 2,26] #
Анти-ТПО, Ед/мл	14,8 [10,6; 19,4]	123,1 [102,0; 163,3] *	225,5 [179,8; 299,6] *, #

**Примечание:** \* -  $p<0,001$  в сравнении с показателями группы здоровых женщин; # –  $p<0,001$  в сравнении с показателями первого обследования.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Таким образом, установлено, что заместительная терапия АИТ левотироксином натрия не оказывает существенного влияния на содержание в сыворотке про- и противовоспалительных цитокинов. Уровни всех исследуемых нами цитокинов при обследовании через 6 месяцев показали значения, достоверно не отличающиеся от исходных ( $p>0,05$ ). При этом по окончании терапии были нивелированы исходно установленные ассоциации АИТ с повышенными концентрациями RANKL и сниженными показателями соотношения OPG/RANKL. Кроме того, прием женщинами с патологией ЩЖ индивидуально подобранной дозы левотироксина натрия обеспечило достоверное ( $p<0,001$ ) снижение исходно повышенных уровней ТТГ до контрольных значений. Для аутоиммунных же анти-ТПО антител, концентрации которых были увеличены при первом обследовании, была характерна обратная динамика – статистически значимое нарастание в течение 6 месяцев наблюдения ( $p<0,001$ ).

Следует отметить, что отдельные авторы указывают на положительный эффект от приема левотироксина, заключающийся в снижении уровня TNF- $\alpha$  [16-18]. Однако необходимо учесть то, что в указанных работах пациенты с АИТ имели исходно повышенные уровни TNF- $\alpha$ , в то время как в нашем исследовании аналогичный показатель был в пределах нормы, что согласуется с данными Botelho I.M.V. et al. [19]. Эти же авторы указывают на снижение исходно повышенных уровней IL-1 $\beta$  и IL-6. При этом уровень IL-6 после заместительной терапии все равно оставался повышенным.

Мы не установили каких-либо изменений содержания IL-4 и IL-8 в динамике лечения. Это не согласуется с данными Здор В.В. [16], описывающим снижение исходно повышенных уровней данных цитокинов через 6 месяцев заместительной терапии. Отметим, что в нашей работе женщины с АИТ изначально характеризовались нормальным содержанием данных маркеров.

Отсутствие существенных изменений в продукции у женщин с АИТ цитокинов IL-10 и IL-17A, показанное в нашем исследовании как до, так и после лечения, не согласуется с данными

Marchiori R.C. et al., обнаружившими достоверное повышение уровня IL-10 в динамике заместительной терапии левотироксином [18].

Выявленная нами нормализация исходно повышенного уровня RANKL, так же, как и сниженных значений индекса OPG/RANKL, по видимому, связана с коррекцией уровня тироксина до нормальных показателей. Результаты отдельных работ указывают на то, что для АИТ с гипотиреозом характерны изменения в системе RANK/RANKL/OPG [20].

Мы обнаружили нарастание уровня анти-ТПО в процессе наблюдения за пациентами с АИТ и гипотиреозом. Следует подчеркнуть, что в исследование отбирались пациенты с впервые выявленным АИТ, что предполагает наличие у них относительно раннего периода заболевания ЩЖ. По всей вероятности, обследование женщин именно в начальную фазу заболевания и позволило нам выявить процесс нарастания титра антител к тироидным антигенам от нормальных уровней до существенно увеличенных. Однако следует указать, что есть исследования, в которых не было обнаружено изменений уровня антител к ТПО в процессе заместительной терапии [21] или даже была установлена динамика снижения уровня вышеуказанных аутоантител на фоне терапии левотироксином [22]. При этом необходимо учитывать, что в данных работах информации о длительности заболевания не приводилось.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При обследовании женщин с АИТ и подтвержденным гипотиреозом, установлено, что заместительная терапия левотироксином натрия в течение 6 месяцев существенно не влияет на продукцию большинства исследованных цитокинов. Как до, так и после лечения женщины с АИТ не отличаются от контрольной группы сыровороточными уровнями TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-8, IL-10, IL-17A и OPG ( $p > 0,05$ ), но вместе с тем характеризуются стабильно увеличенными показателями IL-1 $\beta$  и IL-6 ( $p < 0,001$ ). Проведенное лечение у женщин с АИТ сочетается с нормализацией исходно повышенных ( $p < 0,05$ ) концентраций RANKL и сниженных ( $p < 0,05$ ) значений индекса OPG/RANKL. Кроме того, прием левотироксина обеспечивает динамику снижения ( $p < 0,001$ ) изначально увеличенных ( $p < 0,001$ ) показателей ТТГ до значений контрольной группы. Достоверно увеличенные значения анти-ТПО уже при первом обследовании ( $p < 0,001$ ) демонстрируют существенный прирост ( $p < 0,001$ ) в течение 6 месяцев наблюдения. Полученные результаты целесообразно использовать для оценки у женщин, страдающих АИТ, степени воспалительно-

го и аутоиммунного процесса, функции ЩЖ, в том числе в динамике лечебно-профилактических мероприятий.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors have no conflict of interests to declare.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Грязнова М. А., Хамнуева Л. Ю. Особенности цитокиновой регуляции при аутоиммунной патологии щитовидной железы. Журнал научных статей «Здоровье и образование в XXI веке». 2017;19(7): 33-39.
2. Wiersinga W. M. Hashimoto's Thyroiditis. In: Vitti P., Hegedüs L. (eds) Thyroid Diseases. Endocrinology. Springer, Cham. 2018:205-247. doi:10.1007/978-3-319-45013-1\_7
3. Malaty W. Primary hypothyroidism. 2017. <https://bestpractice.bmj.com/topics/en-us/535/pdf/535.pdf>. Accessed 4 Jan 2017.
4. Carlé A., Laurberg P., Knudsen N., Perrild H., Ovesen L., Rasmussen L.B., Jorgensen T., Pedersen I.B. Thyroid peroxidase and thyroglobulin autoantibodies in patients with newly diagnosed overt hypothyroidism. *Autoimmunity*. 2006;39(6):497-503. doi: 10.1080/08916930600907913
5. Santaguida M. G., Gatto I., Mangino G., Virili C., Stramazzo .I, Fallahi P., Antonelli A., Segni M., Romeo G., Centanni M.. BREG cells in Hashimoto's thyroiditis isolated or associated to further organ-specific autoimmune diseases. *Clin Immunol*. 2017;184:42-47. doi: 10.1016/j.clim.2017.04.012
6. Ramos-Leví A. M., Marazuela M. Pathogenesis of thyroid autoimmune disease: the role of cellular mechanisms. *Endocrinol Nutr*. 2016;63(8):421-429.
7. Autoimmunity from bench to bedside. Anaya J. M., Shoenfeld Y., Rojas-Villarraga A., Levy R. A., Cervera R. Bogota: El Rosario University Press. School of de Medicine and Health Sciences, CREA; 2013.
8. Ates I., Arikani M. F., Altay M., Yilmaz F. M., Yilmaz N., Berker D., Guler S. The effect of oxidative stress on the progression of Hashimoto's thyroiditis. *Arch Physiol Biochem*. 2018; 124(4):351-356. doi:10.1080/13813455.2017.1408660
9. Fröhlich E., Wahl R. Thyroid autoimmunity: role of anti-thyroid antibodies in thyroid and extra-thyroidal diseases. *Front. Immunol*. 2017;8:521. doi:10.3389/fimmu.2017.00521
10. Wang C., Mu Z., Chen Y., Liu J., Ma J., Liu C., Hou Z. Study on Th17/Treg Cells and Cytokines in Hashimoto's Thyroiditis with Different Iodine

- Nutrition Status. *Science Journal of Public Health*. 2021;9(1):12-22. doi:10.11648/j.sjph.20210901.12
11. Болдырева Ю. В., Лебедев И. А., Кручинин Е. В., Алекберов Р. И., Тарасов Д. О., Тяпкин А. В., Козлов М. В., Ахметьянов М. А., Лукашенко А. В., Мокин Е. А., Фидоматова З.Ш. Единый подход к ведению пациентов с аутоиммунным тиреоидитом. *Кардиология*. 2019; 07(175): 110-113. doi: 10.25694/URMJ.2019.07.25
  12. Lee S.A., Stetten N.E., Anton S.D. Patient perspectives on the treatment for Hashimoto's thyroiditis: a qualitative analysis. *Health Prim Car*. 2018;2(4):1-5. doi: 10.15761/HPC.1000141
  13. Ernst F.R., Barr P., Elmor R., Sandulli W., Thevathasan L., Sterman A.B., Goldenberg J., Vora K. The Economic Impact of Levothyroxine Dose Adjustments: the CONTROL HE Study. *Clin Drug Investig*. 2017;37(1):71-83. doi: 10.1007/s40261-016-0462-3
  14. Okosieme O., Gilbert J., Abraham P., Boelaert K., Dayan C., Gurnell M., Leese G., McCabe C., Perros P., Smith V., Williams G., Vanderpump M. Management of primary hypothyroidism: statement by the British Thyroid Association Executive Committee. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2016; 84(6): 799-808. doi: 10.1111/cen.12824
  15. Jonklaas J., Bianco A.C., Bauer A.J., Burman K.D., Cappola A.R., Celi F.S., Cooper D.S., Kim B. W., Peeters R. P., Rosenthal M. S., Sawka A. M. American Thyroid Association Task Force on Thyroid Hormone Replacement. Guidelines for the treatment of hypothyroidism: prepared by the american thyroid association task force on thyroid hormone replacement. *Thyroid*. 2014;24(12):1670-1751. doi:10.1089/thy.2014.0028
  16. Здор В.В. Взаимосвязь гормональной и цитокиновой регуляции при аутоиммунном тиреоидите. *Клиническая и экспериментальная тиреоидология*. 2017;13(2):45-56. doi: 10.14341/ket2017245-56
  17. Tayde P. S., Bhagwat N. M., Sharma P., Sharma B., Dalwadi P. P., Sonawane A., Subramanyam A., Chadha M., Varthakavi P. K. Hypothyroidism and Depression: Are Cytokines the Link? *Indian J Endocrinol Metab*. 2017;21(6):886-892. doi: 10.4103/ijem.IJEM\_265\_17
  18. Marchiori R. C., Pereira L. A., Naujorks A. A., Rovaris D. L., Meinerz D. F., Duarte M. M., Rocha J. B. Improvement of blood inflammatory marker levels in patients with hypothyroidism under levothyroxine treatment. *BMC Endocr Disord*. 2015;15:32. doi: 10.1186/s12902-015-0032-3
  19. Botelho I. M. B., Moura Neto A., Silva C. A., Tambascia M. A., Alegre S. M., Zantut-Wittmann D. E. Vitamin D in Hashimoto's thyroiditis and its relationship with thyroid function and inflammatory status. *Endocrine J*. 2018;65:1029-1037. doi: 10.1507/endocrj.EJ18-0166
  20. Rapacki E., Lauritzen J. B., Madsen C. M., Jørgensen H. L., Nørring-Agerskov D. Thyroid-stimulating hormone (TSH) is associated with 30-day mortality in hip fracture patients. *Eur J Trauma Emerg Surg*. 2019: 1-7. doi: 10.1007/s00068-019-01260-9
  21. Kachouei A., Rezvanian H., Amini M., Aminorroaya A., Moradi E. The Effect of Levothyroxine and Selenium versus Levothyroxine Alone on Reducing the Level of Anti-thyroid Peroxidase Antibody in Autoimmune Hypothyroid Patients. *Adv Biomed Res*. 2018; 7: 1. doi: 10.4103/2277-9175.223735
  22. Liu J., Chen Z., Liu M., Jia Y., Yao Z., Wang G. Levothyroxine Replacement Alleviates Thyroid Destruction in Hypothyroid Patients With Autoimmune Thyroiditis: Evidence From a Thyroid MRI Study. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019; 10: 138. doi: 10.3389/fendo.2019.00138

## REFERENCES

1. Gryaznova M. A., Khamnueva L. Yu. The specific feature of cytokines regulation by pathology of thyroid disease (review). *The Journal of scientific articles "Health and Education Millennium"*. 2017; 19(7): 33-39.
2. Wiersinga W. M. Hashimoto's Thyroiditis. In: Vitti P., Hegedüs L. (eds) *Thyroid Diseases*. Endocrinology. Springer, Cham. 2018: 205-247 doi: 10.1007/978-3-319-45013-1\_7
3. Malaty W. Primary hypothyroidism. 2017. <https://bestpractice.bmj.com/topics/en-us/535/pdf/535.pdf>. Accessed 4 Jan 2017.
4. Carlé A., Laurberg P., Knudsen N., Perrild H., Ovesen L., Rasmussen L.B., Jørgensen T., Pedersen I.B. Thyroid peroxidase and thyroglobulin auto-antibodies in patients with newly diagnosed overt hypothyroidism. *Autoimmunity*. 2006; 39(6): 497-503. doi: 10.1080/08916930600907913
5. Santaguida M. G., Gatto I., Mangino G., Virili C., Stramazzo .I, Fallahi P., Antonelli A., Segni M., Romeo G., Centanni M.. BREG cells in Hashimoto's thyroiditis isolated or associated to further organ-specific autoimmune diseases. *Clin Immunol*. 2017; 184: 42-47. doi: 10.1016/j.clim.2017.04.012
6. Ramos-Leví A.M., Marazuela M. Pathogenesis of thyroid autoimmune disease: the role of cellular mechanisms. *Endocrinol Nutr*. 2016; 63(8): 421-429.
7. Autoimmunity from bench to bedside. Anaya J. M., Shoenfeld Y., Rojas-Villarraga A., Levy R. A., Cervera R. Bogota: El Rosario University Press. School of de Medicine and Health Sciences, CREA; 2013.

8. Ates I., Arikan M. F., Altay M., Yilmaz F. M., Yilmaz N., Berker D., Guler S. The effect of oxidative stress on the progression of Hashimoto's thyroiditis. *Arch Physiol Biochem.* 2018; 124(4): 351-356. doi: 10.1080/13813455.2017.1408660
9. Fröhlich E., Wahl R. Thyroid autoimmunity: role of anti-thyroid antibodies in thyroid and extra-thyroidal diseases. *Front. Immunol.* 2017; 8: 521. doi: 10.3389/fimmu.2017.00521
10. Wang C., Mu Z., Chen Y., Liu J., Ma J., Liu C., Hou Z. Study on Th17/Treg Cells and Cytokines in Hashimoto's Thyroiditis with Different Iodine Nutrition Status. *Science Journal of Public Health.* 2021; 9(1): 12-22. doi: 10.11648/j.sjph.20210901.12
11. Boldyreva Y. V., Lebedev I. A., Kruchinin E. V., Alekberov R. I., Tarasov D. O., Tyapkin A. V., Kozlov M. V., Akhmetianov M. A., Lukashenok A. V., Mokin E. A., Fidomatova Z. Sh. A unified approach to patient management with autoimmune thyroiditis (literature review). *Ural Medical Journal.* 2019;07(175):110-3. (In Russ). doi: 10.25694/URMJ.2019.07.25
12. Lee S. A., Stetten N. E., Anton S. D. Patient perspectives on the treatment for Hashimoto's thyroiditis: a qualitative analysis. *Health Prim Car.* 2018;2(4):1-5. doi: 10.15761/HPC.1000141
13. Ernst F. R., Barr P., Elmor R., Sandulli W., Thevathasan L., Sterman A. B., Goldenberg J., Vora K. The Economic Impact of Levothyroxine Dose Adjustments: the CONTROL HE Study. *Clin Drug Investig.* 2017;37(1):71-83. doi:10.1007/s40261-016-0462-3
14. Okosieme O., Gilbert J., Abraham P., Boelaert K., Dayan C., Gurnell M., Leese G., McCabe C., Perros P., Smith V., Williams G., Vanderpump M. Management of primary hypothyroidism: statement by the British Thyroid Association Executive Committee. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2016; 84(6): 799-808. doi: 10.1111/cen.12824
15. Jonklaas J., Bianco A. C., Bauer A. J., Burman K. D., Cappola A. R., Celi F. S., Cooper D. S., Kim B. W., Peeters R. P., Rosenthal M. S., Sawka A. M. American Thyroid Association Task Force on Thyroid Hormone Replacement. Guidelines for the treatment of hypothyroidism: prepared by the American thyroid association task force on thyroid hormone replacement. *Thyroid.* 2014;24(12):1670-1751. doi: 10.1089/thy.2014.0028
16. Zdor V. V. Correlation of hormonal and cytokines regulation in case of autoimmune thyroiditis. *Clinical and experimental thyroidology.* 2017;13(2):45-56. doi: 10.14341/ket2017245-56
17. Tayde P. S., Bhagwat N. M., Sharma P., Sharma B., Dalwadi P. P., Sonawane A., Subramanyam A., Chadha M., Varthakavi P. K. Hypothyroidism and Depression: Are Cytokines the Link? *Indian J Endocrinol Metab.* 2017;21(6):886-892. doi: 10.4103/ijem.IJEM\_265\_17
18. Marchiori R. C., Pereira L. A., Naujorks A. A., Rovaris D. L., Meinerz D. F., Duarte M. M., Rocha J. B. Improvement of blood inflammatory marker levels in patients with hypothyroidism under levothyroxine treatment. *BMC Endocr Disord.* 2015;15:32. doi: 10.1186/s12902-015-0032-3
19. Botelho I. M. B., Moura Neto A., Silva C. A., Tambascia M. A., Alegre S. M., Zantut-Wittmann D. E. Vitamin D in Hashimoto's thyroiditis and its relationship with thyroid function and inflammatory status. *Endocrine J.* 2018; 65: 1029-1037. doi: 10.1507/endocrj.EJ18-0166
20. Rapacki E., Lauritzen J. B., Madsen C. M., Jørgensen H. L., Nørring-Agerskov D. Thyroid-stimulating hormone (TSH) is associated with 30-day mortality in hip fracture patients. *Eur J Trauma Emerg Surg.* 2019: 1-7. doi: 10.1007/s00068-019-01260-9
21. Kachouei A., Rezvanian H., Amini M., Aminorroaya A., Moradi E. The Effect of Levothyroxine and Selenium versus Levothyroxine Alone on Reducing the Level of Anti-thyroid Peroxidase Antibody in Autoimmune Hypothyroid Patients. *Adv Biomed Res.* 2018; 7: 1. doi: 10.4103/2277-9175.223735
22. Liu J., Chen Z., Liu M., Jia Y., Yao Z., Wang G. Levothyroxine Replacement Alleviates Thyroid Destruction in Hypothyroid Patients With Autoimmune Thyroiditis: Evidence From a Thyroid MRI Study. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019;10:138. doi: 10.3389/fendo.2019.00138



УДК: 57.084.1

DOI: 10.37279/2224-6444-2021-11-3-25-33

## ИЗМЕНЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЭЛЕКТРОКАРДИОГРАММЫ КРЫС ПОД ВЛИЯНИЕМ АЦЕТИЛСАЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ И ЕЕ КОМПЛЕКСНЫХ СОЕДИНЕНИЙ С МЕТАЛЛАМИ

Миронюк И. С., Бiryukova Е. А., Чуян Е. Н., Асанова А. Р.

Кафедра физиологии человека и животных и биофизики, Таврическая академия ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского», 295007, пр-т Вернадского, 4, Симферополь, Россия

**Для корреспонденции:** Чуян Елена Николаевна, доктор биологических наук, профессор, заведующая кафедрой физиологии человека и животных и биофизики, Таврической академии ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского», e-mail: elena-chuyan@rambler.ru

**For correspondence:** Elena N. Chuyan, MD, Professor, Department of Human and Animal Physiology and Biophysics, Taurida Academy of Vernadsky CFU, e-mail: elena-chuyan@rambler.ru

### Information about authors:

**Mironyuk I. S.**, <https://orcid.org/0000-0003-0851-4148>

**Biryukova E. A.**, <https://orcid.org/0000-0003-4538-5517>

**Chuyan E. N.**, <https://orcid.org/0000-0002-6152-2350>

**Asanova A. R.**, <https://orcid.org/0000-0002-0728-8874>

### РЕЗЮМЕ

Исследовано влияние ацетилсалициловой кислоты (АСК) и ее комплексных соединений с металлами кобальта, цинка, никеля и марганца в дозах 5, 10 и 20 мг/кг на электрокардиографические показатели крыс. Показано, что после введения животным АСК и тестируемых салицилатов во всех исследуемых дозах наблюдалось статистически значимое увеличение длительности комплекса QRS относительно значений этого показателя в контрольной группе животных, наиболее выраженное после введения салицилата кобальта в дозе 20 мг/кг как относительно значений этого показателя в контрольной группе, так и у животных, получавших АСК. Анализ длительности интервала QT также продемонстрировал рост данного показателя у животных всех групп, однако наиболее выраженное после введения салицилата марганца. Установлено, что тестируемые салицилаты обладают не только более выраженными, но зачастую и качественно новыми по сравнению с АСК кардиотропными эффектами.

**Ключевые слова:** ацетилсалициловая кислота, салицилаты, электрокардиографические показатели.

### CHANGES IN ELECTROCARDIOGRAM PARAMETERS RATS UNDER THE INFLUENCE OF ACETYLSALICYLIC ACID AND ITS COMPLEX COMPOUNDS WITH METALS

Mironyuk I. S., Biryukova E. A., Chuyan E. N., Asanova A. R.

V. I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Russia

### SUMMARY

The effect of acetylsalicylic acid (ASA) and its complex compounds with cobalt, zinc, nickel and manganese metals at doses of 5, 10 and 20 mg/kg on the electrocardiographic parameters of rats was studied. It was shown that after administration of ASA and the tested salicylates to animals in all the studied doses, there was a statistically significant increase in the duration of the QRS complex relative to the values of this indicator in the control group of animals, most pronounced after administration of cobalt salicylate at a dose of 20 mg/kg both relative to the values of this indicator in the control group and in animals treated with ASA. The analysis of the duration of the QT interval also showed an increase in this indicator in animals of all groups, but the most pronounced after the introduction of manganese salicylate. It was found that the tested salicylates have not only more pronounced, but often qualitatively new cardiotropic effects compared to ASA.

**Key words:** acetylsalicylic acid, salicylates, electrocardiographic parameters.

В настоящее время известно, что салицилаты различных металлов обладают выраженными кардиотропными эффектами, что позволяет рассматривать данные соединения в качестве кандидатов в новые фармакологические препараты [1]. В частности, показано, что соединения ацетилсалициловой кислоты (АСК), имеющие в составе металлы –комплексообразователи  $Co^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  оказывают выраженный эффект

на показатели центральной и периферической гемодинамики животных. Причем тестируемые салицилаты обладают не только более выраженными, но зачастую и качественно новыми по сравнению с АСК кардиотропными эффектами [2]. Поэтому, учитывая перспективность исследования биологических эффектов комплексных соединений АСК с металлами, актуальным является установление дозовой зависимости

действия салицилатов на сердечно-сосудистую систему (ССС). Вместе с тем в современной литературе мы не обнаружили результатов доклинических исследований прямого влияния салицилатов  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$  на работу миокарда, в том числе электрокардиографические (ЭКГ) показатели человека и лабораторных животных. При этом метод ЭКГ позволяет получить представление об интегральных характеристиках деятельности ССС и межсистемных механизмах регуляции, в связи с чем остается значимым в экспериментальной физиологии, патофизиологии, клинических и доклинических исследованиях и имеет широкие перспективы как при оценке эффективности различных лекарственных препаратов, так и фармакологической безопасности и кардиотоксичности новосинтезированных химических соединений.

В связи с этим целью настоящего исследования явилось выявление изменений показателей ЭКГ крыс под влиянием АСК и ее комплексных соединений с металлами кобальта, цинка, никеля и марганца в дозах 5, 10 и 20 мг/кг.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Экспериментальные исследования проводились на базе Центра коллективного пользования научным оборудованием «Экспериментальная физиология и биофизика» Крымского федерального университета им. В.И. Вернадского на кафедре физиологии человека и животных и биофизики.

В исследовании использовались 160 лабораторных половозрелых крыс-самцов 180-250 грамм линии Вистар («ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово»), прошедших карантин не менее 14 дней. Животные содержались в стандартных условиях вивария. Все исследования на животных проводили в соответствии с принципами, изложенными в директиве 2010/63/ЕС Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22.09.2010 г. о защите животных, используемых в научных целях.

В ходе эксперимента было проведено исследование биологической эффективности АСК, катионов металлов  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$  в дозах 5, 10 и 20 мг/кг (чистота не менее 98,0 %; синтезированы на кафедре общей и неорганической химии Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского). Животные были разделены на 16 групп:

1 – контрольная (К) – животным проводили внутривентрикулярные инъекции физиологического раствора ( $\text{NaCl}$ , 0,9 %) объемом 0,2 мл;

2 – 4 – животным данных групп осуществляли внутривентрикулярные инъекции АСК в дозах 5, 10 и 20 мг/кг соответственно объемом 0,2 мл;

5–7 – группы животных, которым проводили внутривентрикулярные инъекции салицилата кобальта в дозах 5, 10 и 20 мг/кг соответственно объемом 0,2 мл;

8 – 10 – животным данных групп проводили внутривентрикулярные инъекции салицилата цинка в дозах 5, 10 и 20 мг/кг соответственно объемом 0,2 мл.

11 – 13 – группы животных, которым проводили внутривентрикулярные инъекции салицилата никеля в дозах 5, 10 и 20 мг/кг соответственно объемом 0,2 мл;

14 – 16 – животным данных групп проводили внутривентрикулярные инъекции салицилата марганца в дозах 5, 10 и 20 мг/кг соответственно объемом 0,2 мл.

Параметры ЭКГ у животных всех групп были зарегистрированы во II стандартном отведении на компьютерном полиграфе «Віорас МР-150» («Віорас Systems, Inc.», США) в условиях ингаляционного изофлуранового наркоза, с целью минимизации артефактов, искажающих запись ЭКГ [3]. Для этого, не ранее чем через 20 минут после внутривентрикулярного введения АСК и тестируемых салицилатов, животным инвазивно накладывали игольчатые датчики по стандартной схеме (верхние конечности – на предплечьях, нижние конечности – на внутренней стороне бедра) после чего, в течение  $5 \pm 3$  мин регистрировали кривую ЭКГ. Для оценки длительности зубцов ЭКГ у всех животных с помощью программы Acknowledge («Віорас Systems, Inc.», США) вычисляли частоту сердечных сокращений (ЧСС) на участке свободном от артефактов длительностью не менее 60 секунд, после чего проводили усреднение данного участка с последующим расчетом длительности комплекса. В качестве наиболее существенных параметров ЭКГ у крыс выделены комплекс QRS (сек, отражает деполяризацию желудочков) и интервал QT (сек, временной промежуток между началом деполяризации миокарда желудочков и окончанием их реполяризации), которые имеют практическое значение для адекватной интерпретации данных экспериментальных исследований [3].

Согласно данным литературы [4], у наркотизированных животных значения как ЧСС, так и длительности составляющих кардиокомплекса отличаются вариабельностью, что связано с видом применяемой анестезии [4]. Известно, что различные препараты могут привести к вегетативным и сердечным изменениям различной степени [5], однако большинство исследователей отмечает, что к действию анестетика наиболее чувствительным параметром является ЧСС [5; 6].

Таким образом, поскольку параметры ЭКГ и эффекты тестируемых соединений могут су-

щественно отличаться у наркотизированных и ненаркотизированных животных, целесообразно все исследования проводить с обязательным использованием контрольной группы, что и было осуществлено в данном исследовании.

Расчеты, статистическая обработка и графическое оформление полученных в работе данных проводились с использованием программ «Acq Knowledge 4.2 for MP150», Microsoft Excel, StatSoft STATISTICA 8. Достоверность статистических различий между контрольной и экспериментальными группами определяли с помощью критерия Манна-Уитни, а достоверность статистических различий между дозами тестируемых соединений определяли с помощью критерия Дана.

Для анализа эффективности биологического действия соединений АСК с металлами по сравнению с молекулой предшественницей (АСК) проводился расчет коэффициента эффективности (КЭ):

$$КЭ = (АС_{мет.} - АСК) / АСК, \quad (1)$$

где  $АС_{мет.}$  – показатели ЭКГ, зарегистрированные у животных при введении салицилатов  $Co^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  (средние значения измерений в каждой экспериментальной группе); АСК – показатели ЭКГ, зарегистрированные у животных при введении АСК (средние значения измерений во 2, 3, 4-ой экспериментальных группах).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

При анализе ЭКГ у животных контрольной группы после внутрибрюшинного введения физиологического раствора исследуемые показатели ЭКГ соответствовали нормальным значениям для крыс линии Wistar [3]: ЧСС –  $401,84 \pm 4,63$  ударов в минуту, длительность комплекса QRS –  $0,04 \pm 0,02$  сек; длительность интервала QT –  $0,09 \pm 0,01$  сек., что согласуется с результатами других экспериментальных исследований [7; 8] (рис. 1; рис. 2 – а, б).

**Изменение ЧСС у животных под влиянием АСК и салицилатов металлов кобальта, цинка, никеля и марганца.**

Результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что введение крысам АСК в дозах 5, 10 и 20 мг/кг приводило к снижению ЧСС на 13,34 % ( $p \leq 0,05$ ), 14,35 % ( $p \leq 0,05$ ) и 16,84 % ( $p \leq 0,05$ ) соответственно по отношению к значениям данного показателя, зарегистрированного в контрольной группе животных (рис. 1), что согласуется с нашими данными, полученными ранее на ненаркотизированных животных [2].

При введении животным  $АСCo^{2+}$  в дозах 5 и 10 мг/кг также было зарегистрировано снижение ЧСС в среднем на 12,26 % ( $p \leq 0,05$ ) по

отношению к контрольным значениям (рис. 1). Наиболее выраженное снижение ЧСС было зарегистрировано при введении  $АСCo^{2+}$  в дозе 20 мг/кг – на 25,31 % ( $p \leq 0,05$ ) относительно контрольных значений и на 10,18% ( $p \leq 0,05$ ), относительно значений, зарегистрированных в группе крыс, которым вводили АСК в той же дозе (рис. 1).

Отметим, что при введении лабораторным животным как  $ACZn^{2+}$ , так и  $ACNi^{2+}$  в дозах 5, 10 и 20 мг/кг наблюдалось однонаправленное снижение ЧСС: в дозе 5 мг/кг – на 9,16 % ( $p \leq 0,05$ ) и на 12,38% ( $p \leq 0,05$ ), 10 мг/к г– на 10,81 % ( $p \leq 0,05$ ) и на 12,89 % ( $p \leq 0,05$ ) и 20 мг/кг на 12,65 % ( $p \leq 0,05$ ) и на 13,41 % ( $p \leq 0,05$ ) соответственно по отношению к значениям этого показателя в контрольной группе животных (рис. 1).

Следует отдельно отметить снижение значений ЧСС при введении  $ACMn^{2+}$ . Так, под влиянием  $ACMn^{2+}$  в дозе 5 мг/кг значения ЧСС у исследуемых животных снизились на 21,01 % ( $p \leq 0,05$ ), при этом введение  $ACMn^{2+}$  в дозах 10 и 20 мг/кг вызывало максимальное снижение ЧСС у исследуемых животных в среднем на 28,13 % ( $p \leq 0,05$ ) по отношению к контрольным значениям и на 8,85 % ( $p \leq 0,05$ ), на 15,10 % ( $p \leq 0,05$ ) и 14,59 % ( $p \leq 0,05$ ) соответственно по отношению к значениям, зарегистрированным в группе животных, которым вводили АСК в тех же дозах (рис. 1).

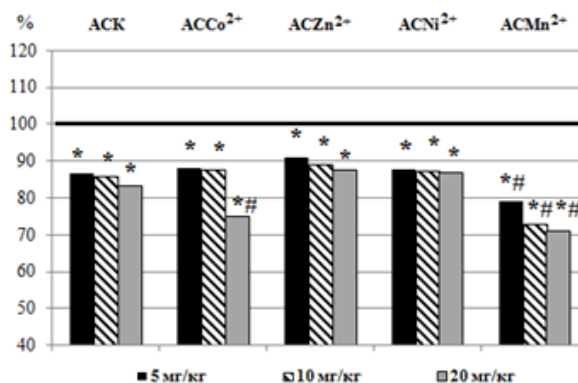


Рис. 1. Изменения частоты сердечных сокращений у крыс при введении ацетилсалициловой кислоты (АСК) и салицилатов кобальта ( $АССo^{2+}$ ), цинка ( $АСZn^{2+}$ ), никеля ( $АСNi^{2+}$ ) и марганца ( $АСMn^{2+}$ ) в дозах 5, 10, 20 мг/кг относительно значений в контрольной группе животных, принятых за 100 %

**Примечание:** \* – уровень достоверности различий по критерию Манна-Уитни относительно значений показателей в контроле; # - уровень достоверности различий по критерию Манна-Уитни относительно значений показателей в группе животных, получавших АСК.

Изменение длительности комплекса QRS на ЭКГ животных под влиянием АСК и салицилатов металлов кобальта, цинка, никеля и марганца.

Введение АСК крысам в дозах 5, 10 и 20 мг/кг приводило к достоверному увеличению длительности комплекса QRS в среднем на 25,00 % ( $p \leq 0,001$ ) по отношению к контрольной группе животных (рис. 2-а).

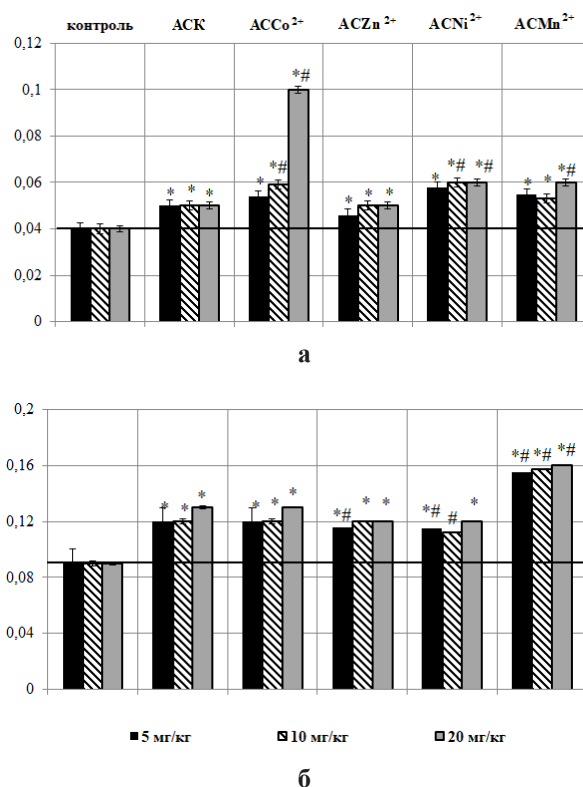
Аналогично действию АСК при введении животным салицилата кобальта в дозах 5 и 10 мг/кг зарегистрировано увеличение длительности комплекса QRS на 35,00 % ( $p \leq 0,05$ ) и 47,50 % ( $p \leq 0,05$ ) соответственно относительно контрольной группы. При этом максимального увеличения QRS достигал при  $ACCo^{2+}$  в дозе 20 мг/кг – на 150% ( $p \leq 0,05$ ) по отношению к значениям, зарегистрированным в контрольной группе животных (рис. 2-а). Следует отметить, что после введения крысам  $ACCo^{2+}$  в дозах 10 и 20 мг/кг длительность комплекса QRS была больше на 18,00 % ( $p \leq 0,05$ ) и 100,00 % ( $p \leq 0,05$ ), чем при введении АСК в тех же дозах, что отражено в положительных значениях коэффициента эффективности (рис. 3-а).

Наблюдались и дозовые различия: увеличение длительности комплекса QRS у животных после введения данного соединения в дозе 20 мг/кг было выражено на 8,00 % ( $p \leq 0,05$ ) и 18,00 % ( $p \leq 0,05$ ) больше по сравнению с его значениями после введения животным в дозах 5 и 10 мг/кг (рис. 2-а).

После введения животным салицилата цинка в дозе 5 мг/кг, аналогично с АСК, длительность комплекса QRS увеличилась на 15,00% ( $p \leq 0,001$ ), а в дозе 10 и 20 мг/кг – в среднем на 25,00% ( $p \leq 0,001$ ) соответственно по отношению к значениям этого показателя в контрольной группе животных (рис. 2-а). При этом значения показателя QRS достоверно не отличались от таковых в группе животных, получавших инъекции АСК (рис. 2-а), о чем свидетельствует КЭ, близкий к нулю (рис. 3-а).

При введении животным салицилата никеля в дозах 5, 10 и 20 мг/кг зарегистрировано увеличение длительности комплекса QRS в среднем на 48,33% ( $p \leq 0,001$ ) по отношению к значениям этого показателя в контрольной группе животных (рис. 2-а). Нужно отметить, что введение животным  $ACNi^{2+}$  в дозах 10 и 20 мг/кг вызвало более выраженное увеличение длительности комплекса QRS в среднем на 20,00% ( $p \leq 0,001$ ) относительно значений этих показателей группы животных, получавших АСК, о чем свидетельствует положительный КЭ (рис. 2-а, 3-а).

Введение салицилата марганца крысам в дозах 5, 10 и 20 мг/кг приводило к достоверному увеличению длительности комплекса QRS на



**Рис. 2. Изменения длительности комплекса QRS в сек. (а) и интервала QT в сек. (б) на электрокардиограмме животных при введении ацетилсалициловой кислоты (АСК) и салицилатов кобальта ( $ACCo^{2+}$ ), цинка ( $ACZn^{2+}$ ), никеля ( $ACNi^{2+}$ ) и марганца ( $ACMn^{2+}$ ) в дозах 5, 10, 20 мг/кг**

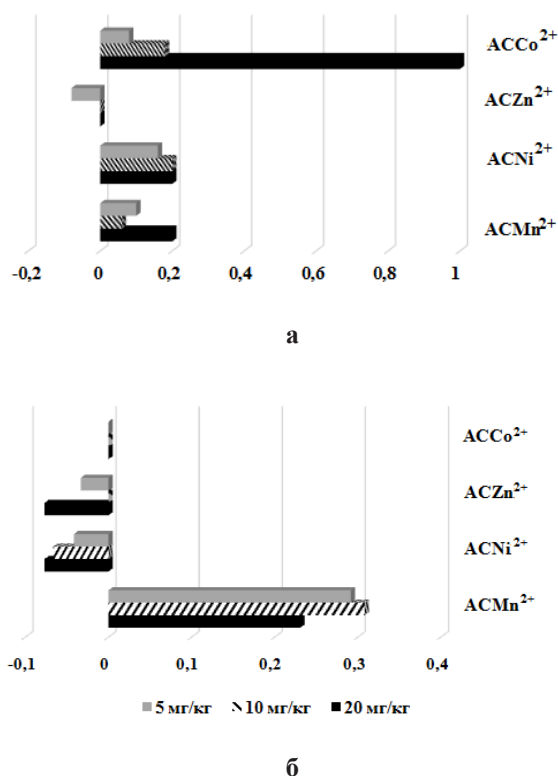
**Примечание:** \* – уровень достоверности различий по критерию Манна-Уитни относительно значений показателей в контроле; # - уровень достоверности различий по критерию Манна-Уитни относительно

37,50 % ( $p \leq 0,001$ ), 32,50 % ( $p \leq 0,001$ ) и 50,00 % ( $p \leq 0,001$ ) соответственно по отношению к таковой в контрольной группе животных (рис. 2-а). При этом после введения крысам  $ACMn^{2+}$  в дозе 20 мг/кг значения показателя QRS были больше на 20,00 % ( $p \leq 0,001$ ), чем при введении АСК в той же дозе, что отражено в положительных значениях КЭ (рис. 2-а, 3-а).

Изменение длительности интервала QT на ЭКГ животных под влиянием АСК и катионов металлов кобальта, цинка, никеля и марганца.

После введения АСК и салицилата кобальта в дозах 5 и 10 мг/кг значения длительности интервала QT однонаправленно увеличивались в среднем на 33,33% ( $p \leq 0,001$ ), а в дозе в 20 мг/кг – на 44,44% ( $p \leq 0,001$ ) относительно значений этого показателя в контрольной группе животных (рис. 2- б).

После введения крысам салицилата цинка в дозе 5 мг/кг также произошло увеличение дли-



**Рис. 3. Коэффициенты эффективности (КЭ) показателей электрокардиограммы: комплекса QRS (а) и интервала QT (б) у животных при введении салицилатов  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$  в дозах 5, 10 и 20 мг/кг в сравнении со значениями этих показателей у животных при введении АСК в тех же дозах**

тельности интервала QT на 28,88% ( $p \leq 0,001$ ), а в дозах 10 и 20 мг/кг в среднем на 33,33% ( $p \leq 0,001$ ) относительно значений этого показателя в контрольной группе животных (рис. 2-б). Введение животным  $\text{ACZn}^{2+}$  в дозе 5 мг/кг вызвало уменьшение длительности интервала QT на 8,34% ( $p \leq 0,001$ ) относительно значений этого показателя в группе животных, получавших АСК, о чем свидетельствует отрицательный КЭ (рис. 3-б). Следует отметить, что уменьшение длительности интервала QT при введении  $\text{ACZn}^{2+}$  в дозе 10 и 20 мг/кг лабораторным животным по отношению к группе АСК не достигало уровня значимости (рис. 2-б).

Салицилат никеля в дозах 5 и 20 мг/кг также вызвал увеличение длительности интервала QT на 27,77% ( $p \leq 0,001$ ) и 33,33% ( $p \leq 0,001$ ) относительно таковых в контрольной группе животных (см. рис. 2-б). Однако по сравнению со значениями данного показателя в группе животных, получавших АСК, длительности интервала QT у крыс после введения  $\text{ACNi}^{2+}$  в дозах 5 и 10 мг/кг была меньше на 4,16% ( $p \leq 0,001$ ) и 6,66% ( $p \leq 0,001$ ), о чем свидетельствуют отрица-

тельные значения КЭ (рис. 2-б, 3-б). Следует отметить, что уменьшение длительности интервала QT при введении  $\text{ACNi}^{2+}$  в дозе 20 мг/кг лабораторным животным, аналогично введению  $\text{ACZn}^{2+}$ , не достигало уровня значимости по отношению к группе АСК (рис. 2-б).

Наиболее выраженное увеличение длительности интервала QT на ЭКГ животных наблюдалось при введении салицилата марганца во всех дозах в среднем на 74,81% ( $p \leq 0,001$ ) относительно значения этого показателя в контрольной группе и на 27,69% ( $p \leq 0,001$ ) относительно значения этого показателя в группе животных, получавших АСК, что подтверждается положительным КЭ (рис. 2-б, 3-б).

Таким образом, анализ длительности интервала показал, что после введения крысам АСК и салицилатов кобальта, цинка, никеля и марганца во всех исследуемых дозах наблюдалось статистически значимое увеличение длительности интервала QT, наиболее выраженное после введения животным салицилата марганца.

## ОБСУЖДЕНИЕ

АСК и тестируемые салицилаты металлов при однократном введении в дозах 5, 10 и 20 мг/кг привели к статистически значимому изменению ЧСС и электрокардиографических показателей у крыс.

Результаты анализа изменения ЧСС свидетельствуют о том, что введение как АСК, так и тестируемых салицилатов двухвалентных металлов приводит к выраженному отрицательному хронотропному эффекту на сердечный ритм лабораторных животных, при этом максимальный брадикардический эффект зарегистрирован при введении  $\text{ACCo}^{2+}$  и  $\text{ACMn}^{2+}$  в дозе 20 мг/кг. Как свидетельствуют литературные данные, снижение ЧСС под влиянием АСК и ее соединений с металлами может происходить за счёт блокирования синтеза простагландинов ( $\text{PGF}_2$  и  $\text{PGE}_2$ ) клетками гладкой мускулатуры кровеносных сосудов и увеличения вагусных влияний на сердце [9; 10].

Объективно оценить механизмы развития брадикардии у лабораторных животных под влиянием АСК и ее производных возможно в результате анализа длительности комплекса QRS и интервала QT на ЭКГ.

Анализ продолжительности комплекса QRS, имеющего ведущее значение для оценки функции миокарда и отражающего время и характер распространения деполяризации по миокарду желудочков [8] показал, что, после введения животным АСК и салицилатов кобальта, цинка, никеля и марганца во всех исследуемых дозах наблюдалось статистически значимое увеличе-

ние длительности комплекса QRS относительно значений этого показателя в контрольной группе животных, наиболее выраженное после введения салицилата кобальта в дозе 20 мг/кг, как относительно значений этого показателя в контрольной группе, так и у животных, получавших АСК.

Изменения ЭКГ крыс под действием  $АСCo^{2+}$ , согласно данным литературы, могут свидетельствовать о развитии патологической брадикардии вследствие нарушения проводимости миокарда на уровне желудочков [11]. Наши данные согласуются с экспериментальными, в которых было выявлено, что введение кобальта крысам оказывало значительный кардиогенный эффект, по своему действию схожий с гипоксией миокарда [11]. При этом кардиотоксический эффект двухвалентных солей кобальта возникает в основном вследствие накопления катиона  $Co^{2+}$  внутри клеток миокарда [12]. Возможно, одним из кардиотоксических эффектов  $Co^{2+}$  является нарушение фундаментальных процессов метаболизма энергии в митохондриях, которые не могут поддерживать адекватный уровень сократительных функций кардиомиоцитов, что влияет как на систолу, так и на диастолу [13].

Следует обратить внимание на то, что кардиотоксический эффект салицилата  $Co^{2+}$  выявлен только в дозе 20 мг/кг, которая, как показали наши исследования острой токсичности тестируемых соединений, приближается к ЛД<sub>50</sub>, равной 30 мг/кг, при которой наблюдалась первая смертность животных [2]. По мнению некоторых авторов, существуют пороговые дозы поступления кобальта в организм, превышение которых приводит к возникновению токсического эффекта [14]. Действительно, патоморфологические и экспериментальные исследования показали, что  $Co^{2+}$  может вызвать дозозависимые структурные расстройства в тканях миокарда, который характеризуется высокой интенсивностью его метаболизма и считается мишенью его токсических эффектов [15], вплоть до некротических изменений в сердце [16]. Результаты исследований *in vitro*, проведенных на культурах кардиомиоцитов, помогли установить, что двухвалентный кобальт стимулирует окислительный стресс и апоптоз в дозозависимой манере [17].

Таким образом, прямые токсические эффекты минеральных солей  $Co^{2+}$ , особенно в больших дозах считаются исключительно негативным фактором, однако, если  $Co^{2+}$  поступает в организм в малых дозах, не превышающих пороговые уровни, то помимо негативных реакций, мы можем наблюдать физиологические эффекты, которые потенциально могут быть применены в практической медицине [18, 19].

Наиболее интересными, по нашему мнению, оказались данные анализа длительности интервала QT (электрическая систола сердца), который отражает сумму процессов деполяризации и последующей реполяризации миокарда желудочков. Из данных литературы известно, что длительность интервала QT не является постоянной величиной и носит нелинейный обратно пропорциональный характер изменению ЧСС [20]. При этом в литературе подробно описано удлинение интервала QT с последующим развитием брадикардии под действием разных лекарственных препаратов [20]. Механизмом этого явления считают пролонгирование фазы реполяризации, которая индуцирует ранние постдеполяризации и пространственную дисперсию рефрактерности [20]. Кроме того, удлинение QT является прогностическим критерием для определения в доклинических исследованиях кардиотоксичности лекарственных препаратов, связанной с развитием патологических аритмий [21] вследствие нарушения работы ионных каналов и изменения скорости выхода ионов калия из клеток миокарда [22].

Полученные нами данные об удлинении интервала QT у лабораторных животных на 20 – 30 % под влиянием  $АСCo^{2+}$ ,  $ACZn^{2+}$ ,  $ACNi^{2+}$  могут быть обусловлены отрицательным хронотропным действием данных веществ. Однако выраженное увеличение длительности QT более чем на 70 % под влиянием салицилата марганца в дозах 5, 10 и 20 мг/кг может быть признаком нарушения проводимости на уровне дистального отдела миокарда у тестируемых групп животных.

Экспериментальные данные согласуются с литературными, в которых показано, что введение  $ACMn^{2+}$  в дозах от 0,5 до 5 мг/кг приводит к увеличению интервала QT и комплекса QRS в ЭКГ мелких лабораторных животных [23], при хронической марганцевой интоксикации наблюдается частое (в среднем в два раза чаще, чем в контроле) поражение проводящей системы сердца в сочетании с тенденцией к брадикардии [23]. Кроме того, введение марганца напрямую влияет на баланс эритроцитов в миокарде, что может играть важную роль в нарушении его сократительной функции [24]. При этом отметим, что выраженное удлинение интервала QT у крыс под влиянием однократного введения салицилата марганца во всех исследуемых дозах, согласно литературным данным [20], может быть обусловлено замедлением асинхронной реполяризации желудочков миокарда, что, следовательно, обуславливает его электрическую нестабильность и является в последующем причиной развития аритмий у исследуемых животных.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, АСК и тестируемые салицилаты металлов при однократном введении в дозах 5, 10 и 20 мг/кг привели к изменению электрокардиографических показателей у крыс. Установлено, что тестируемые салицилаты обладают не только более выраженными, но зачастую и качественно новыми по сравнению с АСК кардиотропными эффектами.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors have no conflict of interests to declare.

## ЛИТЕРАТУРА

- Sokolik J., Tumova I., Vlahova M. Anti-inflammatory activities of copper (II) and zinc (II) 3,6-dimethylsalicylates and their equimolar mixture. *Acta Facult. Farm. Univ. comeniana*. 2006;53(1):224-228.
- Чуян Е. Н., Миронюк И. С., Раваева М. Ю., Черетаев И. В., Гришина Т. В. Показатели кардиореспираторной системы крыс при действии ацетилсалициловой кислоты и её комплексных соединений с металлами. *Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского. Биология. Химия.* 2020;6(2):267-280. doi:10.37279/2413-1725-2020-6-2-267-280.
- Западнюк И. П., Захария Е. А. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте. 3-е изд., перераб. и доп. Киев: Вища школа. Головное изд-во. 1983:383.
- Курьянова Е. В. Влияние наркоза и рефлексорной стимуляции симпатoadренальной и парасимпатической систем на вариабельность сердечного ритма крыс. *Естественные науки. Журнал фундаментальных и прикладных исследований.* 2011;2(35):140-148.
- Zhao Y., Zhou C., Liu J. The quaternary lidocaine derivative QX-314 produces long-lasting intravenous regional anesthesia in rats. *PLoS One.* 2014;9(6):34-41. doi:10.1371/journal.pone.0099704.
- Albrecht M., Henke J., Tacke S., Markert M., Guth B. Effects of isoflurane, ketamine-xylazine and a combination of medetomidine, midazolam and fentanyl on physiological variables continuously measured by telemetry in Wistar rats. *BMC Veterinary Research.* 2014;198(10):95-103. doi:10.1186/s12917-014-0198-3.
- Gui L., Bao, Jia Y., Qin X., Cheng Z., Zhu J., Chen Q. Ventricular tachy arrhythmias in rats with acute myocardial infarction involves activation of small-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2013;304:118-130. doi: 10.1152/ajpheart.00820.2011.
- Carll A., Lust R., Hazari M., Perez C.M., Krantz Q.T. Whole and particle-free diesel exhausts differentially affect cardiac electrophysiology, blood pressure, and autonomic balance in heart failure-prone rats. *Toxicological sciences.* 2012;128(2):490-499. doi:10.1093/toxsci/kfs162.
- Chan F. K., Chung S. C. Preventing recurrent upper gastrointestinal bleeding in patient with *Helicobacter pylori* infection who are taken low dose aspirin or naproxen. *N. Engl. J. Med.* 2001;344:967-973. doi:10.1056/nejm200103293441304.
- Lai K. C., Lam S. K. Lansoprazole for the prevention of recurrences of ulcer complications from long term low dose aspirin use. *N. Engl. J. Med.* 2002;346:2033-2038. doi:10.1056/NEJMoa012877
- Доломатов С. И., Сатаева Т. П., Жуков В. В. Современные аспекты регуляторных, патофизиологических и токсических эффектов, вызываемых ионами кобальта при оральном поступлении в организм человека. *Анализ риска здоровью.* 2019;3:161-174. doi: 10.21668/health.risk/2019.3.19.
- Ryuko S., Ma Y., Ma N., Sakaue M., Kuno T. Genome-wide screen reveals novel mechanisms for regulating cobalt uptake and detoxification in fission yeast. *Mol. Genet. Genomics.* 2012;287(8):651-662. doi:10.1007/s00438-012-0705-9.
- Hantson P. Mechanisms of toxic cardiomyopathy. *Clin. Toxicol.* 2019;57(1):1-9. doi: 10.1080/15563650.2018.1497172
- Catalani S., Leone R., Rizzetti M. C., Padovani A., Apostoli P. The Role of Albumin in Human Toxicology of Cobalt: Contribution from a Clinical Case. *ISRN Hematology.* 2011;6. Article ID 690620. doi: 10.5402/2011/690620.
- Liu Y., Xu H., Liu F., Tao R., Yin J. Effects of serum cobalt ion concentration on the liver, kidney and heart in mice. *Orthopaedic Surgery.* 2010;2(2):134-140. doi:10.1111/j.1757-7861.2010.00076.x.
- Akinrinde A. S., Oyagbemi A. A., Omobowale T. O., Asenuga E. R., Ajibade T. O. Alterations in blood pressure, anti-oxidant status and caspase 8 expression in cobalt chloride-induced cardio-renal dysfunction are reversed by *Ocimum gratissimum* and gallic acid in Wistar rats. *J. Trace. Elem. Med. Biol.* 2016;36:27-37. doi: 10.1016/j.jtemb.2016.03.015.
- He X., Gan L. Zhang B. CoCl<sub>2</sub> induces apoptosis via a ROS-dependent pathway and Drp1-mediated mitochondria fission in periodontal stem cells. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2018; 315(3): 389-397. doi:10.1152/ajpcell.00248.2017.
- Shrivastava K., Ram M. S., Bansal A., Singh S. S., Ilavazhagan G. Cobalt supplementation

- promotes hypoxic tolerance and facilitates acclimatization to hypobarichypoxia in rat brain. *High. Alt. Med. Biol.* 2008;9(1):63-75. doi: 10.1089/ham.2008.1046/
19. Jeon E. S., Shin J. H., Hwang S. J., Moon G. J., Bang O. Y., Kim H. H. Cobalt chloride induces neuronal differentiation of human mesenchymal stem cells through up regulation of mi-croRNA-124a. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2014;444(4):581-587. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.01.114.
20. Воробьев Л. В. ЭКГ-анализ интервала Q-T с позиции физиологичности сердечных сокращений. *Научное обозрение. Медицинские науки.* 2019;1:10-15. doi:10.17513/srms.1059.
21. Lionte C., Bologna C., Sorodoc L. Toxic and Drug Induced Changes of the Electrocardiogram. In: Millis RM, editors. *Advances in Electrocardiograms-Clinical Applications.* Shanghai: Intech. 2012:271-296. doi:10.5772/22891.
22. Braam S., Tertoolen A., Stolpe T., Meyer R., Passier C., Mummery P. Prediction of drug induced cardiotoxicity using human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Stem Cell Res.* 2010;4:107-116. doi: 10.1016/j.scr.2009.11.004.
23. Charash B., Placek E., Sos T. A., Kligfield P. Dose-related effects of manganese on the canine electrocardiogram. *Journal of electrocardiology.* 1982;15(2):149-152. doi: 10.1016/s0022-0736(82)80009-5
24. Волобуева Е. Е., Пимонова С. А., Булычева О. С. Токсические свойства марганца. *Успехи современного естествознания.* 2014;6:87-97.
1. Sokolik J., Tumova I., Blahova M. Anti-inflammatory activities of copper (II) and zinc (II) 3,6-dimethylsalicylates and their equimolar mixture. *Acta Facult. Farm. Univ. comeniana.* 2006;53(1):224-228.
2. Chuyan E. N., Mironyuk I. S., Ravaeva M. Yu., Cheretaev I. V., Grishina T.V. Indicators of the rat cardiorespiratory system under the action of acetylsalicylic acid and its complex compounds with metals. *Scient. notes of the Crimean Feder. Univer. after V.I. Vernadsky. Biology. Chemistry.* 2020;6(2):267-280. doi:10.37279/2413-1725-2020-6-2-267-280. (In Russ).
3. Zapadnyuk I. P., Zakhariya E. A. Laboratory animals. Breeding, maintenance, use in the experiment. 3rd ed., reprint. and add. Kiev: Vishcha school. Head publishing house. 1983:383. (In Russ).
4. Kuriyanova E. V. Effect of narcosis and reflectoring stimulation of sympathetic and parasympathetic systems on the heart variability at rats. 2011;2(35):140-148. (In Russ).
5. Zhao Y., Zhou C., Liu J. et al. The quaternary lidocaine derivative QX-314 produces long-lasting intravenous regional anesthesia in rats. *PLoS One.* 2014;9(6):34-41. doi: 10.1371/journal.pone.0099704.
6. Albrecht M., Henke J., Tacke S., Markert M., Guth B. Effects of isoflurane, ketamine-xylazine and a combination of medetomidine, midazolam and fentanyl on physiological variables continuously measured by telemetry in Wistar rats. *BMC Veterinary Research.* 2014;198(10):95-103. doi: 10.1186/s12917-014-0198-3.
7. Gui L., Bao, Jia Y., Qin X., Cheng Z., Zhu J., Chen Q. Ventricular tachyarrhythmias in rats with acute myocardial infarction involves activation of small-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2013;304:118-130. doi: 10.1152/ajpheart.00820.2011.
8. Carll A., Lust R., Hazari M., Perez C.M., Krantz Q.T. Whole and particle-free diesel exhausts differentially affect cardiac electrophysiology, blood pressure, and autonomic balance in heart failure-prone rats. *Toxicological sciences.* 2012;128(2): 490-499. doi: 10.1093/toxsci/kfs162.
9. Chan F. K., Chung S. C. Preventing recurrent upper gastrointestinal bleeding in patient with Helicobacter pylori infection who are taken low dose aspirin or naproxen. *N. Engl. J. Med.* 2001;344:967-973. doi: 10.1056/nejm200103293441304.
10. Lai K. C., Lam S. K. Lansoprazole for the prevention of recurrences of ulcer complications from long term low dose aspirin use. *N. Engl. J. Med.* 2002;346:2033-2038. doi:10.1056/NEJMoa012877.
11. Dolomatov S. I., Sataeva T. P., Zukow V. Modern aspects of regulatory, pathophysiological and toxic effects of cobalt ions during oral intake in the human body. *Health Risk Analysis,* 2019;3:161-174. doi: 10.21668/health.risk/2019.3.19.eng. (In Russ).
12. Ryuko S., Ma Y., Ma N., Sakaue M., Kuno T. Genome-wide screen reveals novel mechanisms for regulating cobalt uptake and detoxification in fission yeast. *Mol. Genet. Genomics.* 2012;287(8):651-662. doi: 10.1007/s00438-012-0705-9.
13. Hantson P. Mechanisms of toxic cardiomyopathy. *Clin. Toxicol.* 2019;57(1):1-9. doi: 10.1080/15563650.2018.1497172.
14. Catalani S., Leone R., Rizzetti M.C., Padovani A., Apostoli P. The Role of Albumin in Human Toxicology of Cobalt: Contribution from a Clinical Case. *ISRN Hematology.* 2011. Article ID 690620:6. doi: 10.5402/2011/690620.
15. Liu Y., Xu H., Liu F., Tao R., Yin J. Effects of serum cobalt ion concentration on the liver, kidney and heart in mice. *Orthopaedic Surgery.* 2010;2(2):134-140. doi: 10.1111/j.1757-7861.2010.00076.x.
16. Akinrinde A. S., Oyagbemi A. A., Omobowale T. O., Asenuga E. R., Ajibade T. O.



Alterations in blood pressure, anti-oxidant status and caspase 8 expression in cobalt chloride-induced cardio-renal dysfunction are reversed by *Ocimum gratissimum* and gallic acid in Wistar rats. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2016;36: 27-37. doi: 10.1016/j.jtemb.2016.03.015.

17. He X., Gan L., Zhang B. et al. CoCl<sub>2</sub> induces apoptosis via a ROS-dependent pathway and Drp1-mediated mitochondria fission in period on talligament stem cells. *Physiol. Cell. Physiol.* 2018; 315(3): C389-C397. doi: 10.1152/ajpcell.00248.2017.

18. Shrivastava K., Ram M.S., Bansal A., Singh S.S., Ilavazhagan G. Cobalt supplementation promotes hypoxic tolerance and facilitates acclimatization to hypobarichypoxia in rat brain. *High. Alt. Med. Biol.* 2008; 9(1):63-75. doi: 10.1089/ham.2008.1046.

19. Jeon E. S., Shin J. H., Hwang S. J., Moon G. J., Bang O. Y., Kim H. H. Cobalt chloride induces neuronal differentiation of human mesenchymal stem cells through up regulation of mi-croRNA-124a. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2014; 444 (4): 581-587. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.01.114.

20. Vorobyev L. V. ECG analysis of the Q-T interval from the standpoint of the physiology of heart contractions. Scientific review. *Medical sciences.* 2019;1:10-15. doi:10.17513/srms.1059. (In Russ).

21. Lionte C., Bologna C., Sorodoc L. Toxic and Drug Induced Changes of the Electrocardiogram. In: Millis RM, editors. *Advances in Electrocardiograms-Clinical Applications.* Shanghai: Intech. 2012:271-296. doi:10.5772/22891.

22. Braam S., Tertoolen A., Stolpe T., Meyer R., Passier C., Mummery Prediction of drug induced cardiotoxicity using human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Stem Cell Res.* 2010;4:107-116. doi: 10.1016/j.scr.2009.11.004.

23. Charash B., Placek E., Sos T. A., Kligfield P. Dose-related effects of manganese on the canine electrocardiogram. *Journal of electrocardiology.* 1982;15(2):149-152. doi:10.1016/s0022-0736(82)80009-5.

24. Volobueva E. E., Pimonova S. A., Bulycheva O. S. Toxic properties of manganese. The successes of modern natural science. 2014;6:87-97. (In Russ).

## СТРУКТУРНЫЕ ПРЕОБРАЗОВАНИЯ ЖЕЛУДКА КРЫС ЮВЕНИЛЬНОГО ВОЗРАСТА НА ФОНЕ РЕГУЛЯРНОГО ВВЕДЕНИЯ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО НАПИТКА

**Никитина О. В., Кутя С. А., Кривенцов М. А.**

Кафедра нормальной анатомии, Медицинская академия имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского», 295051, бульвар Ленина 5/7, Симферополь, Россия

**Для корреспонденции:** Кутя Сергей Анатольевич, доктор медицинских наук, заведующий кафедрой нормальной анатомии Медицинской академии имени С. И. Георгиевского, ФГАОУ ВО «КФУ им.В. И. Вернадского», e-mail: sergei\_kutya@mail.ru

**For correspondence:** Sergey A. Kutia, MD, Department of Human Anatomy, Medical Academy named after S.I. Georgievsky of Vernadsky CFU, e-mail: sergei\_kutya@mail.ru

### Information about authors:

**Nikitina O. V.**, <https://orcid.org/0000-0002-8688-1608>

**Kutia S. A.**, <http://orcid.org/0000-0002-1145-4644>

**Kriventsov M. A.**, <http://orcid.org/0000-0001-5193-4311>

### РЕЗЮМЕ

В настоящее время энергетические напитки имеют огромную популярность, особенно среди молодежи. Хорошо изучено их негативное влияние на центральную нервную систему, сердечно-сосудистую систему и на некоторые органы пищеварительной системы. Большой практический интерес представляет изучение комплексного влияния энергетических напитков на желудочно-кишечный тракт, и, в частности, на желудок при регулярном, длительном употреблении энергетиков, а также при их употреблении на фоне физической нагрузки, в связи с популярностью употребления энергетиков во время занятий спортом. Целью исследования было установить особенности структурных изменений в тканях желудка крыс при употреблении энергетических напитков с дополнительной физической нагрузкой и без нее. Эксперимент был проведен на 54 двухмесячных самцах крыс линии Вистар. Животным экспериментальных групп ежедневно на протяжении 10, 30 и 60 дней интрагастрально вводили энергетический напиток в объеме 10 мл/кг. Часть из этих животных дополнительно подвергались физической нагрузке, моделируемой на тредбане. Контрольной группе животных вводили дистиллированную воду в таком же объеме. В результате проведенного гистологического описательного анализа какие-либо значительные структурные изменения слизистой оболочки желудка в группе крыс, которым вводился энергетический напиток в течение 10 дней, по сравнению с контрольной группой выявлены не были. Введение энергетического напитка в течение 30 и 60 дней приводит к появлению дегенеративно-некротических и воспалительных изменений в желудке, а также повышению его кислотопродуцирующей и слизиобразующей функции. В группе животных с моделированием физической нагрузки на фоне употребления энергетика изменения аналогичны по своей направленности и выраженности преобразованиям, выявленным в группе крыс без дополнительной физической нагрузки.

**Ключевые слова:** желудок, морфология, энергетический напиток, физическая нагрузка, крысы

### STRUCTURAL TRANSFORMATIONS OF THE STOMACH OF JUVENILE RATS AFTER REGULAR ADMINISTRATION OF AN ENERGY DRINK

**Nikitina O. V., Kutia S. A., Kriventsov M. A.**

Medical Academy named after S. I. Georgievsky of Vernadsky CFU, Simferopol, Russia

### SUMMARY

Nowadays energy drinks are very popular, especially among young people. Their adverse effect on the central nervous system, cardiovascular system and on some organs of the digestive system is well studied. Of great practical interest is the study of the complex effect of energy drinks on the gastrointestinal tract and, in particular, on the stomach during regular, long-term consumption of energy drinks, as well as when they are consumed together with physical activity, due to the popularity of energy drink consumption during sports activities. The aim of the study was to establish the peculiarities of structural changes in the stomach tissues of rats when energy drinks are consumed with and without additional physical exertion. The experiment was performed on 54 two-month-old male Wistar rats. Animals of the experimental groups daily for 10, 30 and 60 days received intragastrically with 10 ml/kg energy drink. Some of these animals were additionally subjected to physical load simulated on a treadmill. The control group of animals received distilled water in the same volume. Histological descriptive analysis revealed no significant structural changes in the gastric mucosa in the group of rats administered the energy drink for 10 days compared with the control group. Administration of the energy drink for 30 and 60 days leads to the appearance of degenerative-necrotic and inflammatory changes in the stomach, as well as an increase in its acid-producing and mucus-forming function. In the group of animals with simulated physical load together with energy drink consumption, the changes are similar in their direction and expression to those found in the group of rats without additional physical load.

**Key words:** stomach, morphology, energy drink, physical load, rats.

Энергетический напиток (энерготоник) – продукт, обладающий возбуждающим эффектом на центральную нервную систему, реализующимся за счет комплекса содержащихся в нем веществ. Его употребление приводит к появлению ощущения бодрости, повышению работоспособности и двигательной активности. Согласно статистическим данным Минздрава РФ, восемь из десяти подростков в возрасте от 13 до 17 лет хотя бы раз в жизни пили энергетик, а каждый третий употреблял их регулярно [1]. Производители энергетических напитков, ссылаясь на собственные исследования, утверждают, что употребление энергетиков не несет в себе вред для здоровья человека. Однако данные многих клинических наблюдений свидетельствуют об обратном [2]. Задokumentировано негативное влияние энергетических напитков на центральную нервную [3; 4], сердечно-сосудистую системы [5]. Имеются данные, но несколько более фрагментарные, о неблагоприятном воздействии энергетиков на мочевую систему [6; 7], органы пищеварительной системы [8; 9; 10]. Большой практический интерес представляет изучение влияния энергетических напитков на желудочно-кишечный тракт, и, в частности, на желудок. При этом имеющиеся в литературе данные в отношении изменений желудка на фоне употребления энергетических напитков являются неполными и несистематизированными. Кроме того, в связи с популярностью употребления энергетиков во время занятий спортом, большое значение имеет изучение последствий систематического употребления энергетических напитков на фоне физической нагрузки.

Цель исследования – установить особенности структурных изменений желудка крыс при употреблении энергетических напитков на фоне дополнительной физической нагрузки и без нее.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование проведено на 54 двухмесячных самцах белых крыс линии Вистар. Животные были распределены на три группы (по 18 крыс в каждой группе): 1) контрольная группа животных, которым ежедневно интрагастрально вводили дистиллированную воду в объеме 10 мл/кг; 2) 1-я экспериментальная группа – животные, которые ежедневно получали энергетический напиток «TORNADO Energy» путем интрагастрального введения в объеме 10 мл/кг; 3) 2-я экспериментальная группа – животные с ежедневной дополнительной физической нагрузкой (бег на тредбане в течение 10 минут, ежедневно) в сочетании с ежедневным введением энергетического напитка в аналогичном объеме. Животные каждой группы были разделены на подгруппы в зависимости от

кратности введения энергетического напитка: 10, 30, 60 дней (по 6 крыс в каждой подгруппе). Из эксперимента крыс выводили путем декапитации под эфирным наркозом.

После проведения макроскопического описания и органографии тангенциально вырезали кусочек желудка, охватывающий все отделы органа. После фиксации в нейтральном формалине материал дегидратировали в автоматическом гистопроцессоре Logos (Mielstone, Италия), заливали в парафиновые блоки и изготавливали срезы толщиной 4 мкм. Полученные препараты окрашивали гематоксилином и эозином. Полученные гистологические препараты переводили в цифровой формат с использованием сканера препаратов Aperio CS2 (Leica Biosystems, Германия) с последующей визуализацией с использованием программного обеспечения Aperio Image Scope. На основании полученных микропрепаратов проводили описательный анализ различных отделов желудка крыс.

Исследования проводились в гистологической лаборатории с иммуногистохимией и электронной микроскопией Центральной научно-исследовательской лаборатории Медицинской Академии имени С.И. Георгиевского (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского».

## РЕЗУЛЬТАТЫ

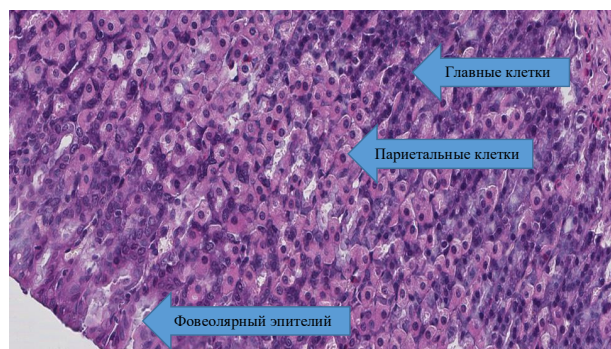
В результате проведенного гистологического описательного анализа какие-либо значительные структурные изменения слизистой оболочки желудка в группе крыс, которым вводили энергетический напиток в течение 10 суток, по сравнению с контрольной группой крыс, отсутствовали.

Результаты исследования в группе крыс, которым вводили энергетический напиток в течение 30 и 60 дней, показали, что, как в безжелезистой (проксимальной части желудка крыс), так и в железистой части (включающей в себя кардиальный отдел, тело, антральный и пилорический отделы) в слизистой оболочке развиваются деструктивные изменения поверхностного эпителия. Слизистая оболочки отечна и разрыхлена, в покровном эпителии присутствуют выраженные дегенеративно-некротические изменения, большинство клеток десквамированы. В области безжелезистой части желудка, выстланной многослойным плоским ороговевающим эпителием, наблюдаются явления гиперкератоза (рис. 1) и акантоза. Данные изменения у животных экспериментальной группы можно расценивать в качестве проявления приспособительного механизма в ответ на действие внешнего повреждающего фактора (компонентов энергетического напитка).



**Рис. 1.** Многослойный плоский ороговевающий эпителий безжелезистой части желудка с явлениями гиперкератоза (30-кратное введение энергетика). Окраска гематоксилином и эозином. Ув. x200.

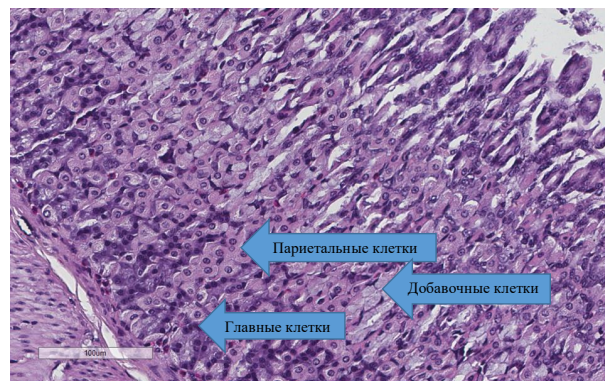
В слизистой оболочке тела желудка у животных наблюдается визуальное увеличение количества париетальных клеток в структуре желудочных желез, с соответствующим уменьшением количества главных клеток, что функционально может означать значительное повышение концентрации соляной кислоты (рис. 2, рис.3) и сдвиг pH желудочного сока в кислую сторону. В некоторых участках преобладание париетальных клетках в железах тела желудка было настолько значительным, что даже в области дна подобных желез обнаруживались практически исключительно париетальные клетки.



**Рис. 2.** Железистая часть желудка (тело желудка). Большая часть желез сформирована париетальными клетками (30-кратное введение энергетика). Окраска гематоксилином и эозином. Ув. x200.

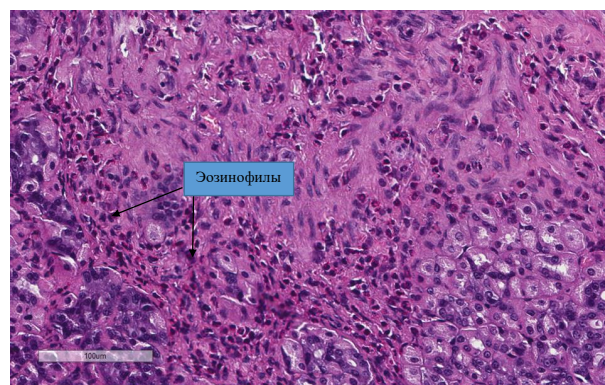
В ряде случаев железистые клетки в теле желудка (главные и париетальные клетки желудочных желез) характеризуются признаками вакуольной дистрофии. Нередко встречаются двуядерные формы клеток, что может указывать на развитие компенсаторно-приспособительных реакций, опять же в ответ на действие повреждающего фактора (компонентов энергетического напитка). Также в области тела желудка на-

блюдается увеличение количества добавочных клеток, продуцирующих слизь, что представляет собой защитный механизм и может косвенно свидетельствовать о повышении кислотопродуцирующей функции слизистой оболочки желудка (рис. 3).



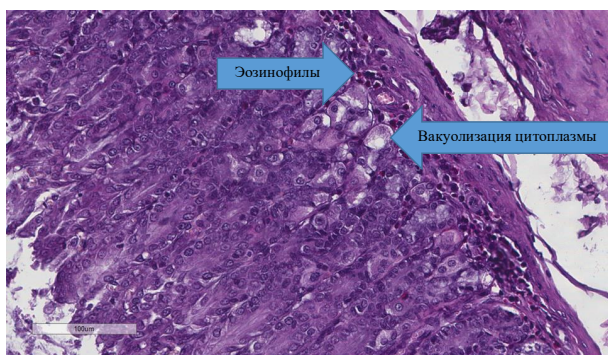
**Рис. 3.** Железистая часть желудка (тело желудка). Преобладание париетальных клеток с относительно небольшим количеством главных клеток и увеличением количества добавочных клеток с признаками активного слизеобразования (30-кратное введение энергетика). Окраска гематоксилином и эозином. Ув. x200.

В собственной соединительнотканной пластинке слизистой оболочки и местами в подслизистой оболочке желудка наблюдается присутствие значительного количества эозинофилов, что указывает на наличие аллергического компонента развивающегося воспалительного ответа. Воспалительный инфильтрат локализуется преимущественно в собственной соединительнотканной пластинке слизистой оболочки, а также в области дна желез.(рис.4). Лишь в редких случаях клетки воспалительного инфильтрата обнаруживаются в более поверхностных отделах слизистой оболочки.



**Рис. 4.** Железистая часть желудка (тело желудка). Выраженная воспалительная инфильтрация с преобладанием эозинофилов в подслизистой оболочке (30-кратное введение энергетика). Окраска гематоксилином и эозином. Ув. x200.

Наиболее выраженные изменения при проведении гистологического описательного анализа выявляются в слизистой оболочке пилорического отдела желудка (рис. 5). Фовеолярный эпителий сохранен лишь в небольшой части желез. В области дна слизистых желез отмечается умеренное количество клеток лимфоидного ряда, а также незначительное количество эозинофилов. Присутствуют единичные интраэпителиальные лимфоциты, указывающие на степень активности воспалительного процесса. Помимо этого, отмечается значительная пролиферативная активность железистого эпителия, проявляющаяся в наличии многочисленных фигур митоза.



**Рис. 5. Железистая часть желудка (пилорический отдел). Фовеолярный эпителий слущен. Вакуолизация цитоплазмы железистых клеток. Воспалительная инфильтрация за счет клеток лимфоидного ряда и эозинофилов (30-кратное введение энергетика). Окраска гематоксилином и эозином. Ув. x200**

В группе животных с моделированием физической нагрузки на фоне употребления энергетика (2-я экспериментальная группа) обнаружены изменения аналогичной направленности и выраженности, что и у крыс 1-й экспериментальной группы (с регулярным введением энергетика без дополнительной физической нагрузки).

### ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам проведенного описательного гистологического анализа показано, что ежедневное введение энергетика на протяжении 10 дней не приводит к значительным структурным изменениям в тканях желудка. Увеличение кратности употребления энергетика до 30-ти и 60-ти приводит к появлению дегенеративно-некротических и воспалительных изменений в желудке, в том числе с развитием аллергического компонента, а также повышению его кислотопродуцирующей и слизеобразующей функции.

Полученные нами данные подтверждают результаты Maini R. et al. [11], также наблюдавших увеличение выработки слизи железами желудка крыс при введении им энергетического напитка

на протяжении 8 недель, и дополняют данные исследования Ayuob N., ElBeshbeishy R. [10], выявивших, что 4-недельное введение напитка «Power Horse» приводит к нарушению антиоксидантной системы, дегенеративным изменениям и индукции апоптоза в слизистой оболочке дна желудка крыс.

В целом, негативное воздействие энергетического напитка, использованного в работе, связано с его основными ингредиентами – кофеином и таурином. Действие кофеина на желудок может опосредоваться следующими механизмами: нарушение метаболизма оксида азота [12]; блокирование IP3 сигнального пути [13]; ингибирование холинергической иннервации [14]. Второй компонент, таурин, обладает способностью усиливать секрецию соляной кислоты с одновременным повышением слизиобразующей функции желудка [15].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведенное исследование позволяет сделать вывод, что при длительном употреблении энергетических напитков происходит ряд изменений в слизистой оболочке желудка, преимущественно в его железистой части. С одной стороны, данные преобразования заключаются в повреждении клеточных и тканевых элементов за счет непосредственного негативного воздействия компонентов энергетического напитка, с последующим развитием воспалительного ответа с преобладанием аллергического компонента. С другой стороны, в ответ на повреждающее действие компонентов энергетического напитка, в слизистой оболочке желудка развиваются компенсаторно-приспособительные реакции, направленные на поддержание или восстановление нарушенной функции и предотвращение дальнейшего негативного специфического воздействия некоторых компонентов энергетика.

**Финансирование.** Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках на-учного проекта № 20-315-90082

**Funding.** The reported study was funded by RFBR, project number 20-315-90082

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors have no conflict of interests to declare.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Шалыгин Л. Д., Еганян Р. А. Энергетические напитки - реальная опасность для здоровья детей, подростков, молодежи и взрослого населения.

Часть 1. Состав энергетических напитков и влияние на организм их отдельных компонентов Профилактическая медицина. 2016;19(1):56-63. doi:10.17116/PROFMED201619156-63.

2. Трофимов Н. С., Кутя С. А., Кривенцов М. А., Мороз Г. А., Гафарова Э. А., Эннанов Э. Х., Никитина О. В., Алексеев М. А., Андреева О. В. Влияние энергетических напитков на здоровье человека. Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины 2019;9(3):75-81.

3. Cerimele J. M., Stern A. P., Jutras-Aswad D. Psychosis following excessive ingestion of energy drinks in a patient with schizophrenia. *Am. J. Psychiatry.* 2010;167:353. doi:10.1176/APPI.AJP.2009.09101456.

4. Machado-Vieira R., Viale C.I., Kapczinski F. Mania associated with an energy drink: The possible role of caffeine, taurine, and inositol. *Canadian Journal of Psychiatry.* 2001;46(5):454-455. doi:10.1177/070674370104600524.

5. Оплетаев В. Ф., Деткова Е. А. Влияние энергетических напитков на сердечно-сосудистую систему подростков. *Вятский медицинский вестник* 2009;1:103-104.

6. Greene E., Oman K., Lefler M. Energy drink-induced acute kidney injury. *Ann. Pharmacother.* 2014;48(10):1366-1370. doi:10.1177/1060028014541997.47.

7. Kelsey D., Berry A.J., Swain R.A. A Case of Psychosis and Renal Failure Associated with Excessive Energy Drink Consumption. *Case Reports in Psychiatry.* 2019;3954161. doi:10.1155/2019/3954161.

8. Kutia S. A., Kriventsov M. A., Moroz G. A., Gafarova E. A., Trofimov N. S. Implications of energy drink consumption for hepatic structural and functional changes: a review. *Nutrition and Food Science.* 2019;50(5):937-953. doi:10.1108/NFS-08-2019-0260.

9. Amira A., Sadika M. Effect of a caffeinated energy drink and its withdrawal on the submandibular salivary gland of adult male albino rats: A histological and immunohistochemical study. *Al-Azhar Dental Journal.* 2016;3(1):55-60. doi:10.21608/EJH.2018.7518.

10. Ayuob N., ElBeshbeishy R. Impact of an energy drink on the structure of stomach and pancreas of albino rat: can Omega-3 provide a protection? *PLOS ONE.* 2016;11(2):1-15. doi:10.1371/journal.pone.0149191.

11. Maini R., Wawryk-Gawda E., Sławiński M., Halczuk P., Cichacz-Kwiatkowska B., Jodłowska-Jędrych B. Overproduction of gastric mucus as a mechanism of stomach's mucosa protection during energy drinks consumption in Wistar rats. *Postepy Hig Med Dosw (online).* 2018;72:376-380. doi:10.5604/01.3001.0011.8259.

12. Cibicek N., Zivna H., Cibicek J., Cermakova E., Vorisek V., Malačkova J., Micuda S., Palicka V. Caffeine does not modulate nutritive blood flow to rat gastric submucosa - a microdialysis study. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.,* 2008;152:83-90. doi:10.5507/bp.2008.013.

13. Hamada E., Nakajima T., Hata Y., Hazama H., Iwasawa K., Takahashi M., Ota S., Omata M. Effect

of caffeine on mucus secretion and agonist-dependent Ca<sup>2+</sup> mobilization in human gastric mucus secreting cells. *Biochim. Biophys. Acta,* 1997;1356:198-206. doi:10.1016/S0167-4889(96)00177-2.

14. Van Nieuwenhoven M. A., Brummer R. M., Brouns F. Gastrointestinal function during exercise: comparison of water, sports drink, and sports drink with caffeine. *J. Appl. Physiol.* 2000;89:1079-1085. doi:10.1152/jappl.2000.89.3.1079.

15. Huang K. H., Chang C. C., Ho J. D., Lu R. H., Tsai L. H. Role of tau-rine on acid secretion in the rat stomach. *J. Biomed. Sci.* 2011;18:11. doi:10.1186/1423-0127-18-11.

## REFERENCES

1. Shalygin L. D., Eganyan R. A. Energy drinks are a real danger to the health of children, adolescents, young people, and adult population. Part 1. Composition of energy drinks and the effect of their individual components on the organism. *Preventive medicine,* 2016;19(1):56-63. doi:10.17116/PROFMED201619156-63. (In Russ.).

2. Trofimov N. S., Kutia S. A., Kriventsov M. A., Moroz G. A., Gafarova E. A., Ennanov E. K., Nikitina O. V., Alekseyev M. A., Andreyeva O. V. Energy drinks and their impact to the human health. *Crimean journal of experimental and clinical medicine,* 2019;9(3):75-81. (In Russ.).

3. Cerimele J. M., Stern A. P., Jutras-Aswad D. Psychosis following excessive ingestion of energy drinks in a patient with schizophrenia. *Am. J. Psychiatry.* 2010;167:353. doi:10.1176/APPI.AJP.2009.09101456.

4. Machado-Vieira R., Viale C. I., Kapczinski F. Mania associated with an energy drink: The possible role of caffeine, taurine, and inositol. *Canadian Journal of Psychiatry.* 2001;46(5):454-455. doi:10.1177/070674370104600524

5. Opletaev V. F., Detcova E. A. The effect of energy drinks on the cardiovascular system of adolescents. *Vyatka Medical Bulletin.* 2009;1:103-104. (In Russ.).

6. Greene E., Oman K., Lefler M. Energy drink-induced acute kidney injury. *Ann. Pharmacother.* 2014;48(10):1366-1370. DOI: 10.1177/1060028014541997.47.

7. Kelsey D., Berry A.J., Swain R.A. A Case of Psychosis and Renal Failure Associated with Excessive Energy Drink Consumption. *Case Reports in Psychiatry.* 2019;3954161. doi:10.1155/2019/3954161.

8. Kutia S. A., Kriventsov M. A., Moroz G. A., Gafarova E. A., Trofimov N. S. Implications of energy drink consumption for hepatic structural and functional changes: a review. *Nutrition and Food Science.* 2019;50(5):937-953. doi:10.1108/NFS-08-2019-0260.

9. Amira A., Sadika M. Effect of a caffeinated energy drink and its withdrawal on the submandibular salivary gland of adult male albino rats: A histological and immunohistochemical study. *Al-Azhar Dental Journal.* 2016;3(1):55-60. doi:10.21608/EJH.2018.7518.

10. Ayuob N., ElBeshbeishy R. Impact of an energy drink on the structure of stomach and pancreas of albino

rat: can Omega-3 provide a protection? PLOS ONE. 2016;11(2):1-15. DOI: 10.1371/journal.pone.0149191.

11. Maini R., Wawryk-Gawda E., Sławiński M., Halczuk P., Cichacz-Kwiatkowska B., Jodłowska-Jędrych B. Overproduction of gastric mucus as a mechanism of stomach's mucosa protection during energy drinks consumption in Wistar rats. *Postepy Hig Med Dosw (online)*, 2018;72:376-380. doi:10.5604/01.3001.0011.8259.

12. Cibicek N., Zivna H., Cibicek J., Cermakova E., Vorisek V., Malackova J., Micuda S., Palicka V. Caffeine does not modulate nutritive blood flow to rat gastric submucosa - a microdialysis study. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.* 2008;152:83-90. doi:10.5507/bp.2008.013.

13. Hamada E., Nakajima T., Hata Y., Hazama H., Iwasawa K., Takahashi M., Ota S., Omata M. Effect of caffeine on mucus secretion and agonist-dependent  $Ca^{2+}$  mobilization in human gastric mucus secreting cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1997;1356:198-206. doi:10.1016/S0167-4889(96)00177-2.

14. Van Nieuwenhoven M. A., Brummer R. M., Brouns F. Gastrointestinal function during exercise: comparison of water, sports drink, and sports drink with caffeine. *J. Appl. Physiol.* 2000;89:1079-1085. DOI: 10.1152/jappl.2000.89.3.1079.

15. Huang K. H., Chang C. C., Ho J. D., Lu R. H., Tsai L. H. Role of tau-rine on acid secretion in the rat stomach. *J. Biomed. Sci.* 2011;18:11. doi:10.1186/1423-0127-18-11.

УДК: 616(.5-006.81+009.7):[576.311.347:577.128]:616.092.9 DOI: 10.37279/2224-6444-2021-11-3-40-47

## ПОЛОВЫЕ РАЗЛИЧИЯ В СОДЕРЖАНИИ СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ В МИТОХОНДРИЯХ КЛЕТОК СЕРДЦА НА ЭТАПАХ РАЗВИТИЯ МЕЛАНОМЫ B16/F10, СОПРЯЖЕННОЙ С ХРОНИЧЕСКОЙ НЕЙРОГЕННОЙ БОЛЬЮ

Франциянц Е. М., Нескубина И. В., Каплиева И. В., Сурикова Е. И., Черярина Н. Д., Бандовкина В. А., Погорелова Ю. А., Шихлярова А. И., Трепитаки Л. К., Немашкалова Л. А., Позднякова В. В., Солдаткина Н. В., Маслов А. А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 344037, ул. 14 линия, 63, Ростов-на-Дону, Россия

Для корреспонденции: Ирина Валерьевна Нескубина? к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории изучения патогенеза злокачественных опухолей, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» МЗ РФ, e-mail: nesclubina.irina@mail.ru

For correspondence: Irina V. Neskubina, PhD, senior researcher at Laboratory of Malignant Tumor Pathogenesis Study, National Medical Research Centre for Oncology, e-mail: nesclubina.irina@mail.ru

### Информация об авторах:

Frantsiyants E. M., <http://orcid.org/0000-0003-3618-6890>

Neskubina I. V., <https://orcid.org/0000-0002-7395-3086>

Kaplieva I. V., <http://orcid.org/0000-0002-3972-2452>

Surikova E. I., <http://orcid.org/0000-0002-4318-7587>

Cheryarina N. D., <http://orcid.org/0000-0002-3711-8155>

Bandovkina V. A., <http://orcid.org/0000-0002-2302-8271>

Pogorelova Yu. A., <http://orcid.org/0000-0002-2674-9832>

Shikhlyarova A. I., <https://orcid.org/0000-0003-2943-7655>

Trepitaki L. K., <http://orcid.org/0000-0002-9749-2747>

Nemashkalova L. A., <https://orcid.org/0000-0003-2713-8598>

Pozdnyakova V. V., <https://orcid.org/0000-0002-3782-6899>

Soldatkina N. V., <https://orcid.org/0000-0003-4902-5789>

Maslov A. A., <https://orcid.org/0000-0002-0118-4935>

### РЕЗЮМЕ

Целью исследования было изучение уровня стероидных гормонов в митохондриях клеток сердца на этапах роста меланомы B16/F10, сопряженной с хронической нейрогенной болью у мышей линии C57BL/6 обоего пола. Работа выполнена на мышах линии C57BL/6 обоего пола (n=336). Экспериментальные группы: интактная (♂ n=21; ♀ n=21); контрольная (♂ n=21; ♀ n=21) - модель хронической нейрогенной боли (ХНБ); группа сравнения (♂ n=63; ♀ n=63) - мыши с меланомой (B16/F10); основная (♂ n=63; ♀ n=63) (ХНБ+B16/F10) - меланому перевивали через 3 недели после создания ХНБ. В митохондриальных образцах методом ИФА определяли концентрацию: эстрадиола (пг/г белка), эстрона (пг/г белка), прогестерона (нг/г белка), общего тестостерона (нг/г белка), свободного тестостерона (пг/г белка). При ХНБ изменения уровней половых гормонов были определены только в митохондриях сердца мышей-самок: эстрадиол был снижен в 4,6 раза, эстрон в 2,2 раза, прогестерон в 1,8 раза (p<0,05), общий тестостерон в 2,4 раза по сравнению с интактными значениями. Рост меланомы (3 недели) у самок снижал уровень эстрадиола в 1,7 раза (p<0,05), эстрона в 1,8 раза (p<0,05), прогестерона в 2,1 раза и общего тестостерона в 2,3 раза относительно интактных значений. У самцов в этот же срок снижался лишь уровень общего тестостерона в 2,1 раза. Рост меланомы на фоне ХНБ (3 недели) у самок снижал уровень эстрадиола в 1,6 раза (p<0,05) относительно контрольных величин. При этом у самцов обнаружено снижение уровней эстрадиола, общего и свободного тестостерона в 1,3 раза (p<0,05), в 1,9 раза (p<0,05) и 2,7 раза, а также повышенный уровень эстрона в 1,6 раза (p<0,05). В большей степени ХНБ и рост меланомы B16/F10 ослабляет сердце самок через вовлечение более широкого спектра гормонов и снижение их уровней в митохондриях сердца, нежели у самцов. При сочетании ХНБ с меланомой B16/F10 у самцов определялась более существенная разбалансировка гормонального фона, чем у самок.

**Ключевые слова:** митохондрии клеток, сердце, меланома B16/F10, хроническая нейрогенная боль, эстрадиол, эстрон, прогестерон, тестостерон, мышцы.

### GENDER DIFFERENCES IN LEVELS OF STEROID HORMONES IN HEART CELL MITOCHONDRIA AT THE STAGES OF B16/F10 MELANOMA DEVELOPMENT COMBINED WITH CHRONIC NEUROGENIC PAIN

Frantsiyants E. M., Neskubina I. V., Kaplieva I. V., Surikova E. I., Cheryarina N. D., Bandovkina V. A., Pogorelova Yu. A., Shikhlyarova A. I., Trepitaki L. K., Nemashkalova L. A., Pozdnyakova V. V., Soldatkina N. V., Maslov A. A.

National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don, Russia



## SUMMARY

Aim - an analysis of levels of steroid hormones in heart cell mitochondria at the stages of B16/F10 melanoma development in combination with chronic neurogenic pain in male and female C57BL/6 mice. The study included male and female C57BL/6 mice (n=336). Experimental groups were: intact animals (♂ n=21; ♀ n=21); controls (♂ n=21; ♀ n=21) with a model of chronic neurogenic pain (CNP); the comparison group (♂ n=63; ♀ n=63) with melanomas (B16/F10); the main group (♂ n=63; ♀ n=63) (CNP+B16/F10) with melanoma transplanted 3 weeks after the CNP model creation. Levels of estradiol (pg/g protein), estrone (pg/g protein), progesterone (ng/g protein), total testosterone (ng/g protein), and free testosterone (pg/g protein) were determined by ELISA in mitochondrial samples. In animals with CNP, changes in levels of steroid hormones were detected only in heart mitochondria of female mice: estradiol was reduced by 4.6 times, estrone by 2.2 times, progesterone by 1.8 times (p<0.05), and total testosterone by 2.4 times compared with intact values. Melanoma growth (3 weeks) in females downregulated levels of estradiol by 1.7 times (p<0.05), estrone by 1.8 times (p<0.05), progesterone by 2.1 times, and total testosterone by 2.3 times compared with intact values. In males, only total testosterone decreased by 2.1 times during the same period. Melanoma growth in presence of CNP (3 weeks) in females decreased levels of estradiol by 1.6 times (p<0.05) compared with control values, while males showed reduced levels of estradiol and total and free testosterone by 1.3 times (p<0.05), 1.9 times (p<0.05) and 2.7 times, respectively, as well as elevated levels of estrone by 1.6 times (p<0.05). CNP and the growth of B16/F10 melanoma to a greater extent weaken the heart of females due to the involvement of a wider spectrum of hormones and a decrease in their levels in the heart mitochondria, compared to males. When CNP was combined with B16/F10 melanoma, a more significant hormonal imbalance was determined in males than in females.

**Key words:** cell mitochondria, heart, B16/F10 melanoma, chronic neurogenic pain, estradiol, estrone, progesterone, testosterone, mice.

Открытие комплексной регуляции функций митохондрий гормонами – одно из важных достижений митохондриологии [1]. Эстрогены оказывают прямое и косвенное влияние на функцию митохондрий в различных тканях. Роль эстрогенов во влиянии на функциональное состояние митохондрий была достаточно хорошо определена [2; 3], однако защитные эффекты эстрогенов в митохондриях еще предстоит полностью выяснить [2; 3]. Известно, что стероидные рецепторы - ER $\alpha$  и ER $\beta$  присутствуют в митохондриях различных морфологических типов клеток и тканей [4]. Эстрогены регулируют функцию митохондрий для достижения своих физиологических и фармакологических эффектов через активацию геномных ER $\alpha$  и ER $\beta$ , которые в свою очередь стимулируют транскрипцию ядерного респираторного фактора - NRF-1, и напрямую взаимодействуют с митохондриальной ДНК (мтДНК), чтобы способствовать ее транскрипции [5]. Вместе с тем системный недостаток ER $\alpha$  приводит к ультраструктурному повреждению и снижению дыхательной функции изолированных митохондрий сердца мышцы после сердечной ишемии-реперфузии [6]. В исследовании Kamraengsri T. et al. (2021) [7] было высказано предположение, что истощение женских половых гормонов нарушает митохондриальную аутофагию в сердце. Стероидные рецепторы на мембранах митохондрий экспрессируют сигнал митохондриальной локализации (MLS) [8], а прогестерон напрямую влияет на митохондриальную активность через сигнал-рецептор MLS. Этот путь ведет к прогестерон-зависимому увеличению клеточного дыхания и может играть определенную роль во многих физиологических процессах, начиная от модуля-

ции клеточного дыхания до более масштабного воздействия на ткани, требующие повышенной энергии для удовлетворения метаболических потребностей организма [8].

Ряд исследований установили, что тестостерон оказывает защитное действие на митохондрии [9]. У кастрированных крыс индукция инфаркта миокарда (ИМ) вызывала более серьезные изменения в митохондриальных структурах, приводящие к апоптозу кардиомиоцитов и нарушению сердечной функции [10; 9]. Эти митохондриальные изменения были блокированы добавлением тестостерона с ассоциированным увеличением АМР-активируемой протеинкиназы (АМРК), которая важна для регуляции клеточного энергетического гомеостаза и инициацией рецептора- $\gamma$ , активируемого пролифератором пероксисом коактиватором 1 (PGC1 $\alpha$ ), являющийся коактиватором митохондриального биогенеза в клетках [10]. Кроме того было определено, что апоптоз кардиомиоцитов и окислительный стресс снижаются за счет активации тестостероном фосфорилирования серин-треонинкиназы (Akt) в сердечных миоцитах [11; 9]. Анализируя все выше сказанное можно утверждать, что половые гормоны защищают митохондрии, путем сдерживания апоптоза, стабилизации структуры митохондрий, модуляции клеточного дыхания, а значит, непосредственно влияют на функциональное состояние органов в целом. Бесспорно, изучение патогенетических механизмов любой болезни требует привлечение экспериментальных моделей и приемов [12; 13; 14], что является фундаментом для адаптированных клинических исследований на людях.

Целью исследования явилось изучение уровня стероидных гормонов в митохондриях клеток

сердца на этапах роста меланомы B16/F10, сопряженной с хронической нейрогенной болью у мышей линии C57BL/6 обоего пола.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено на мышах линии C57BL/6 (n=336) обоего пола 8 недельного возраста с начальной массой 21-22 г. Животные были получены из ФГБУ МНИЦ Научный центр биомедицинских технологий «Андреевка» ФМБА (Московская область). В работе использовали клеточную линию мышинной меланомы B16/F10, полученную из ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Работа с животными проводилась в соответствии с правилами «Европейской конвенции о защите животных, используемых в экспериментах» (Директива 86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации, а также в соответствии с «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» и приказом Минздрава России от 19 июня 2003 г. № 267 «Об утверждении правил лабораторной практики». Животные содержались при естественном режиме освещения со свободным доступом к воде и пище. Комиссией по биоэтике ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России от 19. 12. 2019, был одобрен протокол исследования (протокол этического комитета №14/74). Манипуляции с животными производили в боксе с соблюдением общепринятых правил асептики и антисептики.

Животные каждого пола были распределены методом случайной выборки на экспериментальные группы: интактная (♂ n=21; ♀ n=21); контрольная (♂ n=21, ♀ n=21) - воспроизведение модели хронической нейрогенной боли (ХНБ) [15]; группа сравнения (♂ n=63, ♀ n=63) - стандартная подкожной перевивка меланомы (B16/F10); основная группа (♂ n=63, ♀ n=63) (ХНБ+B16/F10) - меланому трансплантировали через 3 недели после создания модели ХНБ. Мышам основной группы (ХНБ+B16/F10) осуществляли перевязку седалищных нервов с 2-х сторон под ксила-золетилловым наркозом: ксилазин (препарат Ксила) внутримышечно, в дозе 0,05 мл/кг (по инструкции), через 10 минут вводили Золетил-50 в дозе 10 мг/100г. Через 3 недели после заживления операционной раны подкожно под правую лопатку вводили 0,5 мл взвеси опухолевых клеток меланомы B16/F10 в физиологическом растворе в разведении 1:10. Животным из группы сравнения трансплантировали меланому B16/F10 подкожно в той же дозе и объеме, что и в основной группе, но без воспроизведения модели ХНБ. Животных из основной группы и группы сравнения декапитировали

на гильотине в следующие сроки роста меланомы B16/F10: 1-я неделя -7 день роста, 2-я неделя - 14 день роста и 3-я неделя -21 день роста.

После декапитации у животных быстро извлекали сердце и выделяли митохондрии по методу Егоровой М.В., Афанасьева С.А. (2011) [16] с применением холодого дифференциального центрифугирования на высокоскоростной рефрижераторной центрифуге Avanti J-E, BEMAN COULTER, USA. Митохондриальные образцы (концентрация белка 4-6 г/л) до анализа хранили при -80°C в среде выделения. В образцах митохондрий с помощью тест-систем на ИФА-анализаторе (Infinite F50 Tecan, Austria) определяли концентрацию: эстрадиола (пг/г белка), эстрогена (пг/г белка) (DBC, Канада); прогестерона (нг/г белка), общего тестостерона (нг/г белка), свободного тестостерона (пг/г белка) (ХЕМА, Россия) и белка в мг/мл - биуретовым методом (Ольвекс Диагностикум, Россия) на автоматическом анализаторе ChemWell (Awareness Technology INC, USA).

Статистический анализ результатов проводили – пакет программ Statistica 10.0. Полученные данные подвергали анализу на соответствие распределения признаков нормальному закону распределения с использованием критерия Шапиро-Уилка (для малых выборок). Сравнение количественных данных в группах (независимые выборки) проводили с использованием критерия Краскела-Уоллиса (множественные сравнения). Данные таблиц представлены в виде  $M \pm m$ , где  $M$  - среднее арифметическое значение,  $m$  - стандартная ошибка среднего, за уровень статистической значимости принимали  $p < 0,05$ . Полученные результаты статистически обрабатывали с соблюдением общих рекомендаций для медицинских исследований.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты эксперимента по изучению содержания половых гормонов в митохондриях клеток сердца мышей самок и самцов при влиянии роста меланомы B16/F10 и хронической нейрогенной боли представлены в таблицах 1 и 2.

Установлено, что у мышей-самок ХНБ способствовала снижению содержания большинства изучаемых половых гормонов в митохондриях клеток сердца (таблица 1). Так уровень эстрадиола был снижен в 4,6 раза, уровень эстрогена в 2,2 раза, уровень прогестерона в 1,8 раза ( $p < 0,05$ ) и уровень общего тестостерона в 2,4 раза соответственно. Вместе с тем, в митохондриях клеток сердца мышей-самцов при ХНБ не было зафиксировано статистически значимых изменений в уровне определяемых гормонов (таблица 2).

Таблица 1

**Содержание половых гормонов в митохондриях клеток сердца самок мышей в динамике роста меланомы B16/F10, сопряженной с хронической нейрогенной болью**

	Эстрадиол пг/г белка	Эстрон пг/г белка	Прогестерон нг/г белка	Тестостерон общий нг/г белка	Тестостерон свободный пг/г белка
Интактная группа	87,32±4,281	70,832±4,385	1,4113±0,170	0,932±0,099	1,2538±0,144
Контрольная группа (ХНБ)	18,855±2,3951 $p_1=0,0000$	32,643±3,2971 $p_1=0,0000$	0,764±0,0771 $p_1=0,0047$	0,3816±0,0561 $p_1=0,0004$	1,0187±0,129
Рост меланомы B16/F10 (группа сравнения)					
1 неделя	51,745±3,4691 $p_1=0,0000$	39,828±2,9501 $p_1=0,0000$	0,7971±0,0901 $p_1=0,0078$	0,3776±0,0531 $p_1=0,0003$	0,9372±0,128
2 неделя	60,661±3,8551 $p_1=0,0005$	28,89±3,4631 $p_1=0,0000$	0,7635±0,0981 $p_1=0,0064$	0,4225±0,0411 $p_1=0,0004$	1,1908±0,148
3 неделя	52,394±3,1521 $p_1=0,0000$	38,807±2,9121 $p_1=0,0000$	0,6559±0,0781 $p_1=0,0016$	0,3970±0,0531 $p_1=0,0004$	1,0491±0,125
ХНБ + рост меланомы B16/F10 (основная группа)					
1 неделя	63,372±3,8052 $p_2=0,0000$	35,171±3,426	0,9347±0,125	0,6115±0,0562 $p_2=0,0134$	1,0868±0,123
2 неделя	35,704±4,2832 $p_2=0,0000$	35,309±3,338	0,8459±0,107	0,6424±0,0432 $p_2=0,0031$	1,1333±0,145
3 неделя	11,855±1,8572 $p_2=0,0394$	38,097±3,851	0,7425±0,081	0,3178±0,043	0,9516±0,123

Примечание: статистически значимые различия 1 - по отношению к уровню в интактной группе; 2 - по отношению к уровню в группе ХНБ (контроль). ХНБ – хроническая нейрогенная боль.

Таблица 2

**Содержание половых гормонов в митохондриях клеток сердца самцов мышей в динамике роста меланомы B16/F10, сопряженной с хронической нейрогенной болью**

	Эстрадиол пг/г белка	Эстрон пг/г белка	Прогестерон нг/г белка	Тестостерон общий нг/г белка	Тестостерон свободный пг/г белка
Интактная группа	70,361±4,565	42,962±4,347	1,156±0,163	0,8547±0,126	0,89184±0,121
Контрольная группа (ХНБ)	61,378±4,231	48,225±4,637	0,785±0,089	0,7891±0,111	0,83145±0,123
Рост меланомы B16/F10 (группа сравнения)					
1 неделя	51,229±3,1131 $p_1=0,0046$	53,739±4,249	1,1206±0,134	0,6166±0,047	1,0667±0,144
2 неделя	87,813±4,236	46,667±3,651	1,0051±0,140	0,6362±0,0711 $p_1=0,0073$	0,9005±0,132
3 неделя	59,272±3,991	38,01±3,956	0,8225±0,114	0,4125±0,0541 $p_1=0,0000$	1,2494±0,171
ХНБ + рост меланомы B16/F10 (основная группа)					
1 неделя	55,531±3,684	31,171±3,5482 $p_2=0,0128$	0,8095±0,114	0,3833±0,0632 $p_2=0,0080$	1,2443±0,156
2 неделя	49,011±3,800	45,161±3,692	0,9629±0,137	0,5326±0,078	0,86209±0,137
3 неделя	46,346±3,7142 $p_2=0,02041$	76,11±5,3832 $p_2=0,0020$	0,7185±0,081	0,4245±0,0592 $p_2=0,0137$	0,3098±0,0472 $p_2=0,0019$

Примечание: статистически значимые различия 1 - по отношению к уровню в интактной группе; 2 - по отношению к уровню в группе ХНБ (контроль). ХНБ – хроническая нейрогенная боль.

Следующий раздел работы был посвящен изучению уровней половых гормонов в митохондриях сердца животных на этапах роста меланомы B16/F10 (таблица 1, 2). У мышей-самок в митохондриях сердца через 1 неделю роста меланомы было зафиксировано снижение уровня эстрадиола в 1,7 раза ( $p < 0,05$ ), уровня эстрона в 1,8 раза ( $p < 0,05$ ), уровня прогестерона в 1,8 раза ( $p < 0,05$ ) и общего тестостерона в 2,5 раза по сравнению со значениями в интактной группе. У самцов мышей в этот же период (1 неделя) роста меланомы отмечали статистически значимое снижение всего одного уровня гормона – эстрадиола в 1,4 раза ( $p < 0,05$ ). Через 2 недели роста меланомы B16/F10 у мышей-самок уровни эстрадиола, эстрона, прогестерона и общего тестостерона оставались ниже интактных значений в 1,4 раза ( $p < 0,05$ ), 2,4 раза, 1,8 раза ( $p < 0,05$ ) и 2,2 раза соответственно. В то же время, у самцов статистически значимые изменения содержания гормонов в митохондриях сердца не были выявлены. Через 3 недели роста меланомы B16/F10 динамика изучаемых гормонов у самок соответствовала предыдущей неделе эксперимента. Так уровни эстрадиола, эстрона, прогестерона и общего тестостерона продолжали быть сниженными по сравнению с интактными значениями в 1,7 раза ( $p < 0,05$ ), в 1,8 раза ( $p < 0,05$ ), в 2,1 раза и 2,3 раза соответственно. У самцов через 3 недели по сравнению с интактными значениями уровень общего тестостерона снизился в 2,1 раза.

В финальной части работы было проведено изучение сочетанного влияния ХНБ и злокачественного процесса на содержание половых гормонов в митохондриях клеток сердца у самок и самцов мышей (таблица 1, 2). Через 1 неделю роста меланомы B16/F10 на фоне ХНБ у мышей-самок в митохондриях сердца выявили высокие уровни эстрадиола и общего тестостерона по сравнению со значениями в контрольной группе в 3,4 раза и в 1,6 раза ( $p < 0,05$ ) соответственно. У самцов на данном этапе развития опухоли на фоне ХНБ обнаружили низкие значения эстрона в 1,5 раза ( $p < 0,05$ ) и общего тестостерона в 2 раза. Через 2 недели у самок уровень эстрадиола был уже не столь высоким и отличался от контрольных значений всего в 1,9 раза ( $p < 0,05$ ), а общий тестостерон оставался на уровне предыдущего срока, превышая контрольные величины в 1,7 раза ( $p < 0,05$ ). Вместе с тем, у самцов статистически значимые изменения в уровне определяемых гормонов не отмечали. Через 3 недели сочетанного влияния двух патологических процессов (ХНБ+меланома B16/F10) у самок было определено, что в митохондриях сердца уровень всего одного гормона - эстрадиола статистиче-

ски значимо изменился и стал в 1,6 раза ( $p < 0,05$ ) ниже контрольных величин. В то же время у самцов обнаружено снижение уровней эстрадиола, общего тестостерона и свободного тестостерона в 1,3 раза ( $p < 0,05$ ), в 1,9 раза ( $p < 0,05$ ) и 2,7 раза, а также повышенный уровень эстрона в 1,6 раза ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, на всех этапах эксперимента в митохондриях клеток сердца в зависимости от пола было зафиксировано различное количество гормонов, вовлеченных в патологические процессы. Наиболее активно отреагировали митохондрии сердца самок при ХНБ и росте меланомы B16/F10, митохондрии сердца самцов проявляли большую стабильность при ХНБ и меланоме B16/F10. Однако при сочетании ХНБ и меланомы B16/F10 отмечали сниженный гормональный фон именно у самцов. Объединяет все выявленные особенности функционирования митохондрий сердца самок и самцов не зависимо от патологии факт снижения уровня половых гормонов, что свидетельствует об ослаблении гормональной защиты митохондрий.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Для сохранения адекватной функции сердца в условиях любой патологии необходим хорошо сбалансированный гормональный и метаболический гомеостаз для поддержания энергетического метаболизма миокарда [17]. Митохондрии, которые до сих пор были описаны как основной источник клеточной энергии, также являются местом синтеза всех стероидных гормонов [18]. К ним относятся прогестагены (например, прогестерон), минералокортикоиды (например, альдостерон), глюкокортикоиды (например, кортизол и кортикостерон), андрогены (например, тестостерон) и эстрогены (например, эстриол) [19].

Следует отметить, что женский и мужской организмы имеют качественно разные митохондрии [18]. В самом деле, даже если все митохондрии и мтДНК однозначно унаследованы от матери [18], различия в составе и функции белков приобретаются в процессе развития, и в результате многие аспекты биологии митохондрий у взрослых животных различаются по полу [20]. Отчасти это связано с тем, что половые гормоны регулируют биогенез и функцию митохондрий [21]. Метаболические сигнатуры, которые косвенно отражают митохондриальный и клеточный метаболизм всего организма, показывают, что в норме до одной трети метаболитов различаются между женщинами и мужчинами [18].

Поскольку установлен факт существования различного исходного уровня метаболитов в целом, а также гормонального фона в митохондри-

ях в зависимости от пола [18], то можно предположить, что и проявления митохондриального дисбаланса, присутствующие в организме в ответ на патологический процесс будут различны у каждого пола. В представленном исследовании было определено, что в ответ на ХНБ в митохондриях клеток сердца самок мышей произошло одновременное снижение четырех определяемых гормонов (эстрадиол, эстрон, прогестерон, общий тестостерон) из пяти, в то время как у самцов ни одного. Следовательно, хронический болевой синдром в большей степени ослабляет сердце самок через вовлечение более широкого спектра гормонов и снижение их уровня в митохондриях сердца, нежели у самцов.

Похожая ситуация фиксировалась и в случае самостоятельного роста меланомы B16/F10, в митохондриях сердца у самок был выявлен низкий гормональный фон по четырем показателям (эстрадиол, эстрон, прогестерон, общий тестостерон) против одного показателя (прогестерон) у самцов. Данный факт показывает, что меланома B16/F10 вызывает более выраженную дестабилизацию митохондрий сердца у самок, чем у самцов. Различия по полу в дестабилизирующем влиянии меланомы на гормональный фон самок и самцов были показаны ранее в немалигнизированных органах [22] и в злокачественной опухоли и окружающих тканях [23]. По результатам представленного исследования можно утверждать, что независимо от пола животных имеет место вовлечение немалигнизированного органа - сердца в опухолевую болезнь с дестабилизацией субклеточных структур, в которых созданы условия, приводящие к подавлению защитных гормонозависимых механизмов.

Совершенно другая ситуация складывается в случае возникновения двух патологических процессов (ХНБ и меланома B16/F10) в организме животных сообразно полу. У самок на начальном этапе роста опухоли, сочетанной с ХНБ в митохондриях сердца, отмечался повышенный гормональный фон по двум показателям (эстрадиол, общий тестостерон), при этом у самцов напротив фиксировали снижение по двум показателям - эстрон, общий тестостерон. К терминальному этапу роста опухоли, сопряженной с ХНБ у самок регистрировали изменения всего по одному показателю - снижению эстрадиола, а у самцов определялась более существенная разбалансировка гормонального фона с превалированием сниженного уровня эстрадиола, общего и свободного тестостерона.

Известно, что тестостерон оказывает защитное действие на митохондрии кардиомиоцитов, а при его отсутствии происходит индукция инфаркта миокарда вызывая серьезные изменения

в митохондриальных структурах с дальнейшим усилением апоптоза кардиомиоцитов [10]. По результатам представленного исследования, именно на третьей недели сочетанного влияния ХНБ и меланомы на организм мышей-самцов, определялось падение уровня, как общего тестостерона, так и свободного в митохондриях сердца, что свидетельствует о снижении защитного действия тестостерона и возможном усилении апоптоза. Защитные резервы митохондрий сердца были ослаблены еще и за счет падения уровня эстрадиола мышей-самцов в этих же условиях двух патологий. Следует отметить, что не только эстрадиол, но и другие стероидные гормоны регулируют дыхательную способность митохондрий и участвуют в подавлении окислительного стресса [18]. Следовательно, можно говорить об опосредованном гормональном регулировании функций митохондрий, а значит в данном случае (ХНБ + меланома B16/F10) об активации апоптоза, о снижении функции дыхания митохондрий сердца у самцов с усилением окислительного стресса.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя итог данному исследованию, хотелось бы отметить, что у экспериментальных животных обоего пола (мышь линии C57BL/6) были определены половые различия в стероидном статусе митохондрий сердца при ХНБ, росте меланомы и сочетании ХНБ с меланомой. Патологически измененный гормональный фон у представителей каждого пола влечет за собой соответственно и разный подход к осмыслению патогенетических факторов, а значит и их коррекции. Полагаем, что включение представителей обоих полов в экспериментальные исследования способствуют дальнейшему развитию более адаптированных доклинических и клинических исследований исходя из известных половых различий в митохондриальной биологии, физиологии стресса и риске заболеваний у людей.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of Interests.** The authors declare that there is no conflict of interests.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Кулинский В. И., Колесниченко Л. С. Регуляция гормонами и сигнал-трансдукторными системами метаболических и энергетических функций митохондрий. Биомедицинская химия. 2006;52(5):425-447.
2. Jia G, Aroor A. R, Sowers J. R. Chapter Nine - Estrogen and Mitochondria Function in Cardiorenal Metabolic Syndrome. In: Heinz DO (ed) Progress in Molecular Biology and Translational Science.

- 2014;127:229-249. doi: 10.1016/B978-0-12-394625-6.00009-X.
3. Carson J. A, Manolagas S. C. Effects of sex steroids on bones and muscles: Similarities, parallels, and putative interactions in health and disease. *Bone*. 2015;80:67–78. doi:10.1016/j.bone.2015.04.015.
  4. Psarra A-M. G, Sekeris C. E. Glucocorticoid receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria and possible functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*. 2009;1787:431–436. doi:10.1016/j.bbabo.2008.11.011.
  5. Klinge C. M. Estrogens regulate life and death in mitochondria. *J Bioenerg Biomembr*. 2017;49(4):307-324. doi: 10.1007/s10863-017-9704-1.
  6. Zhai P, Eurell T. E, Cooke P. S, Lubahn D. B, Gross D. R. Myocardial ischemia-reperfusion injury in estrogen receptor-alpha knockout and wild-type mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;278:1640–1647.
  7. Kampaengsri T, Ponpuak M, Wattanapernpool J, Bupha-Intr T. Deficit of female sex hormones desensitizes rat cardiac mitophagy. *Chin J Physiol*. 2021;64(2):72-79. doi: 10.4103/cjp.cjp\_102\_20. PMID: 33938817.
  8. Qunsheng Dai, Anish A. Shah, Rachana V. Garde, Bryan A. Yonish, Li Zhang, Neil A. Medvitz, Sara E. Miller, Elizabeth L. Hansen, Carrie N. Dunn, Thomas M. Price. A Truncated Progesterone Receptor (PR-M) Localizes to the Mitochondrion and Controls Cellular Respiration. *Molecular Endocrinology*. 2013;27(5):741–753, doi:10.1210/me.2012-1292.
  9. Bianchi V. E. Testosterone, myocardial function, and mortality. *Heart Fail Rev*. 2018;23:773–788. doi:10.1007/s10741-018-9721-0.
  10. Wang F, Yang J, Sun J, Dong Y, Zhao H, Shi H, Fu L. Testosterone replacement attenuates mitochondrial damage in a rat model of myocardial infarction. *J Endocrinol*. 2015;225(2):101–111. doi:10.1530/JOE-14-0638.
  11. Ikeda Y, Aihara K, Akaike M, Sato T, Ishikawa K, Ise T, Yagi S, Iwase T, Ueda Y, Yoshida S, Azuma H, Walsh K, Tamaki T, Kato S, Matsumoto T. Androgen receptor counteracts doxorubicin-induced cardiotoxicity in male mice. *Mol Endocrinol*. 2010;24(7):1338–1348. doi:10.1210/me.2009-0402.
  12. Сидоренко Ю. С., Франциянц Е. М., Комарова Е. Ф., Погорелова Ю. А., Шихлярова А. И. Способ получения экспериментальных злокачественных опухолей легких. Патент на изобретение RU 2375758 С1, 10.12.2009. Заявка № 2008133091/14 от 11.08.2008.
  13. Франциянц Е. М., Каплиева И. В., Сурикова Е. И., Нескубина И. В., Бандовкина В. А., Трепитаки Л. К., Лесовая Н. С., Черярина Н. Д., Погорелова Ю. А., Немашкалова Л. А. Влияние нокаута по гену урокиназы на рост меланомы в эксперименте. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2019;39(4):62-70.
  14. Жукова Г. И., Шихлярова А. И., Логинова Л. Н., Протасова Т. П. Эффекты комбинированного воздействия низкоинтенсивного электромагнитного излучения миллиметрового диапазона и комплексов незаменимых аминокислот у крыс-опухоленосителей старческого возраста. *Южно-российский онкологический журнал*. 2020;1(4):38-46.
  15. Кит О. И., Франциянц Е. М., Каплиева И. В., Трепитаки Л. К., Котиева И. М. Способ модификации хронической болью злокачественного роста меланомы В16 у мышей. Патент на изобретение RU 2650587 С1, 16.04.2018. Заявка № 2017114818 от 26.04.2017.
  16. Егорова М. В., Афанасьев С. А. Выделение митохондрий из клеток и тканей животных и человека: Современные методические приемы. *Сибирский медицинский журнал*. 2011;26(1-1):22-28.
  17. Peter Wolf, Yvonne Winhofer, Martin Krššák, Michael Krebs. Heart, lipids and hormones. *Endocr Connect*. 2017;6(4):59–69. doi:10.1530/EC-17-0031.
  18. Martin Picard, Bruce S McEwen, Elissa S Epel, Carmen Sandi. An energetic view of stress: Focus on mitochondria. *Front Neuroendocrinol*. 2018;49:72–85. doi:10.1016/j.yfrne.2018.01.001.
  19. Midzak A, Papadopoulos V. Adrenal mitochondria and steroidogenesis: from individual proteins to functional protein assemblies. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2016;7:106. doi: 10.3389/fendo.2016.00106.
  20. Ventura-Clapier R, Moulin M, Piquereau J, Lemaire C, Mericskay M, Veksler V, Garnier A. Mitochondria: a central target for sex differences in pathologies. *Clin Sci (Lond)*. 2017;131:803–822. doi:10.1042/CS20160485.
  21. Gaignard P, Liere P, Therond P, Schumacher M, Slama A, Guennoun R. Role of sex hormones on brain mitochondrial function, with special reference to aging and neurodegenerative diseases. *Front Aging Neurosci*. 2017;9:406. doi: 10.3389/fnagi.2017.00406.
  22. Франциянц Е. М., Бандовкина В. А., Каплиева И. В., Трепитаки Л. К., Черярина Н. Д., Димитриади С. Н., Пржедецкий Ю. В. Влияние роста перевивной меланомы в16/f10 на функционирование гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой и тиреоидной осей организма у самцов и самок мышей. *Известия вузов. Северо-Кавказский регион. Естественные науки*. 2017;3-2(195-2):118-124.
  23. Бандовкина В.А., Франциянц Е.М., Погорелова Ю.А., Черярина Н.Д. Особенности стероидогенеза в опухоли и окружающих тканях при экспериментальной меланоме В16. *Молекулярная медицина*. 2015;5:47-51.

## REFERENCES

1. Kulinskij V. I., Kolesnichenko L. S. Regulation of metabolic and energetic mitochondrial functions by hormones and signal transduction systems. *Biochemistry*. 2006;52(5):425-447. (In Russ.).
2. Jia G, Aroor A. R, Sowers J. R. Chapter Nine - Estrogen and Mitochondria Function in Cardiorenal Metabolic Syndrome. In: Heinz DO (ed) *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. 2014;127:229-249. doi: 10.1016/B978-0-12-394625-6.00009-X.

3. Carson J. A, Manolagas S. C. Effects of sex steroids on bones and muscles: Similarities, parallels, and putative interactions in health and disease. *Bone*. 2015;80:67–78. doi:10.1016/j.bone.2015.04.015.
4. Psarra A-M. G, Sekeris C. E. Glucocorticoid receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria and possible functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*. 2009;1787:431–436. doi:10.1016/j.bbabo.2008.11.011.
5. Klinge C. M. Estrogens regulate life and death in mitochondria. *J Bioenerg Biomembr*. 2017;49(4):307-324. doi: 10.1007/s10863-017-9704-1.
6. Zhai P, Eurell T. E, Cooke P. S, Lubahn D. B, Gross D. R. Myocardial ischemia-reperfusion injury in estrogen receptor-alpha knockout and wild-type mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;278:1640–1647.
7. Kampaengsri T, Ponpuak M, Wattanapernpool J, Bupha-Intr T. Deficit of female sex hormones desensitizes rat cardiac mitophagy. *Chin J Physiol*. 2021;64(2):72-79. doi: 10.4103/cjp.cjp\_102\_20. PMID: 33938817.
8. Qunsheng Dai, Anish A. Shah, Rachana V. Garde, Bryan A. Yonish, Li Zhang, Neil A. Medvitz, Sara E. Miller, Elizabeth L. Hansen, Carrie N. Dunn, Thomas M. Price. A Truncated Progesterone Receptor (PR-M) Localizes to the Mitochondrion and Controls Cellular Respiration. *Molecular Endocrinology*. 2013;27(5):741–753, doi:10.1210/me.2012-1292.
9. Bianchi V. E. Testosterone, myocardial function, and mortality. *Heart Fail Rev*. 2018;23:773–788. doi:10.1007/s10741-018-9721-0.
10. Wang F, Yang J, Sun J, Dong Y, Zhao H, Shi H, Fu L. Testosterone replacement attenuates mitochondrial damage in a rat model of myocardial infarction. *J Endocrinol*. 2015;225(2):101–111. doi:10.1530/JOE-14-0638.
11. Ikeda Y, Aihara K, Akaike M, Sato T, Ishikawa K, Ise T, Yagi S, Iwase T, Ueda Y, Yoshida S, Azuma H, Walsh K, Tamaki T, Kato S, Matsumoto T. Androgen receptor counteracts doxorubicin-induced cardiotoxicity in male mice. *Mol Endocrinol*. 2010;24(7):1338–1348. doi:10.1210/me.2009-0402.
12. Sidorenko YU. S., Franciyanc E. M., Komarova E. F., Pogorelova YU. A., Shihlyarova A. I. Method for obtaining experimental malignant lung tumors. Patent for the invention RU 23758 C1, 10.12.2009. Application № 2008133091/14 dated 11.08.2008. (In Russ.).
13. Franciyanc E. M., Kaplieva I. V., Surikova E. I., Neskubina I. V., Bandovkina V. A., Trepitaki L. K., Lesovaya N. S., Cheryarina N. D., Pogorelova YU. A., Nemashkalova L. A. Effect of urokinase gene-knockout on growth of melanoma in experiment. *Siberian Scientific Medical Journal*. 2019;39(4):62-70. (In Russ.).
14. Zhukova G. I., Shihlyarova A. I., Loginova L. N., Protasova T. P. The effects of combined action of low-intensity electromagnetic radiation of the millimeter range and complexes of essential amino acids in tumor-bearing rats of old age. *South Russian Journal of Cancer*. 2020;1(4):38-46. (In Russ.).
15. Kit O. I., Franciyanc E. M., Kaplieva I. V., Trepitaki L. K., Kotieva I. M. A method for modifying the malignant growth of melanoma B16 in mice by chronic pain. Patent for the invention RU 2650587 C1, 16.04.2018. Application № 2017114818 dated 26.04.2017. (In Russ.).
16. Egorova M.V., Afanas'ev S.A. isolation of mitochondria from cells and tissues of animals and human: modern methodical approaches. *Siberian Medical Journal*. 2011;26(1-1):22-28.. 2011;26(1-1):22-28. (In Russ.).
17. Peter Wolf, Yvonne Winhofer, Martin Krššák, Michael Krebs. Heart, lipids and hormones. *Endocr Connect*. 2017;6(4):59–69. doi:10.1530/EC-17-0031.
18. Martin Picard, Bruce S McEwen, Elissa S Epel, Carmen Sandi. An energetic view of stress: Focus on mitochondria. *Front Neuroendocrinol*. 2018;49:72–85. doi:10.1016/j.yfrne.2018.01.001.
19. Midzak A, Papadopoulos V. Adrenal mitochondria and steroidogenesis: from individual proteins to functional protein assemblies. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2016;7:106. doi: 10.3389/fendo.2016.00106.
20. Ventura-Clapier R, Moulin M, Piquereau J, Lemaire C, Mericskay M, Veksler V, Garnier A. Mitochondria: a central target for sex differences in pathologies. *Clin Sci (Lond)*. 2017;131:803–822. doi:10.1042/CS20160485.
21. Gaignard P, Liere P, Therond P, Schumacher M, Slama A, Guennoun R. Role of sex hormones on brain mitochondrial function, with special reference to aging and neurodegenerative diseases. *Front Aging Neurosci*. 2017;9:406. doi: 10.3389/fnagi.2017.00406.
22. Franciyanc E. M., Bandovkina V. A., Kaplieva I. V., Trepitaki L. K., Cheryarina N. D., Dimitriadi S. N., Przhedekij YU. V. Influence of transplantable B16/F10 melanoma growth on hypothalamic-pituitary-adrenal and thyroid axes in male and female mice. *News of higher educational institutions. Science journal bulletin of higher education institutes north caucasus region. Natural sciences*. 2017;3-2(195-2):118-124. (In Russ.).
23. Bandovkina V. A., Franciyanc E. M., Pogorelova YU. A., Cheryarina N. D. Characteristics of steroidogenesis in the tumor and surrounding tissue in experimental melanoma B16. *Molecular medicine*. 2015;5:47-51. (In Russ.).

УДК:61-092.9:616(43+006):[612.176.2+616.61]:577.121 DOI: 10.37279/2224-6444-2021-11-3-48-55

## СОДЕРЖАНИЕ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ 9 И КОРТИЗОЛА В ОРГАНАХ-МИШЕНЯХ ДИАБЕТИЧЕСКИХ ОСЛОЖНЕНИЙ ПРИ РОСТЕ КАРЦИНОМЫ ГЕРЕНА НА ФОНЕ САХАРНОГО ДИАБЕТА У КРЫС

Франциянц Е. М., Бандовкина В. А., Каплиева И. В., Сурикова Е. И., Нескубина И. В., Трепитаки Л. К., Черярина Н. Д., Погорелова Ю. А., Качесова П. С., Горошинская И. А., Котиева И. М., Морозова М. И., Туманян С. В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Ростов-на-Дону, Россия, 344037, ул. 14 линия, 63

Для корреспонденции: Черярина Наталья Дмитриевна, врач-лаборант ЛИПЗО ФГБУ «НМИЦ онкологии» МЗ РФ, e-mail: scalolas.92@yandex.ru

For correspondence: Cheryarina Natalia D., laboratory assistant at Laboratory of Malignant Tumor Pathogenesis Study, National Medical Research Centre for Oncology of the Ministry of Health of Russia, e-mail: scalolas.92@yandex.ru

### Information about authors:

Frantsiyants E. M., <http://orcid.org/0000-0003-3618-6890>

Bandovkina V. A., <http://orcid.org/0000-0002-2302-8271>

Kaplieva I. V., <http://orcid.org/0000-0002-3972-2452>

Surikova E. I., <http://orcid.org/0000-0002-4318-7587>

Neskubina I. V., <https://orcid.org/0000-0002-7395-3086>

Trepitaki L. K., <http://orcid.org/0000-0002-9749-2747>

Cheryarina N. D., <http://orcid.org/0000-0002-3711-8155>

Pogorelova Yu. A., <http://orcid.org/0000-0002-2674-9832>

Kachesova P. S., <https://orcid.org/0000-0001-6928-5014>

Goroshinskaya I. A., <http://orcid.org/0000-0001-6265-8500>

Kotieva I. M., <https://orcid.org/0000-0003-0252-4708>

Morozova M. I., <https://orcid.org/0000-0001-7640-6021>

Tumanyan S. V., <https://orcid.org/0000-0002-1411-0433>

### РЕЗЮМЕ

Сахарный диабет (СД) является независимым фактором, повышающим риск возникновения неблагоприятного течения различных злокачественных опухолей. Роль MMP-9 в физиологических и патологических процессах, связанных с ремоделированием и деградацией клеточного матрикса широка и не однозначна. Кортизол является одним из признанных маркеров стресса, вызывающих обширные физиологические реакции. Самцы и самки белых нелинейных крыс были разделены на группы: интактные, индуцированный СД, карцинома Герена, карцинома Герена на фоне СД. При СД в самостоятельном и сочетанном вариантах у самок крыс уровень MMP-9 в сердце был ниже, чем у интактных животных в 5,0 и 1,5 раза ( $p < 0,05$ ), а у самцов, напротив, выше в 1,4 раза и 1,7 раза ( $p < 0,05$ ). В почках самок уровень MMP-9 при СД в самостоятельном варианте и сочетанном был ниже, чем у интактных животных в 8,5 раза и 1,8 раза ( $p < 0,05$ ), тогда как у самцов был ниже только у животных с самостоятельным ростом карциномы Герена в 1,4 раза ( $p < 0,05$ ). Содержание кортизола в сердце и почках у самцов и у самок исследуемых групп превышало показатели интактных животных (у самок в группе с СД и СД + карцинома Герена в 1,5 раза ( $p < 0,05$ ) и 3,1 раза в сердце и в 2,6 раза и 3,1 раза в почках; у самцов в 1,5 раза и 1,4 раза ( $p < 0,05$ ) в сердце и в 1,5 раза и 1,7 раза ( $p < 0,05$ ) в почках). Половые различия в содержании MMP-9 при исследованных патологиях могут свидетельствовать о разных механизмах развития диабетических осложнений в ткани сердца и почек.

**Ключевые слова:** сахарный диабет, карцинома Герена, почки, сердце, MMP-9, кортизол, крысы.

### LEVELS OF METALLOPROTEINASE-9 AND CORTISOL IN TARGET ORGANS OF DIABETES COMPLICATIONS DURING THE GROWTH OF GUERIN'S CARCINOMA IN RATS

Frantsiyants E. M., Bandovkina V. A., Kaplieva I. V., Surikova E. I., Neskubina I. V., Trepitaki L. K., Cheryarina N. D., Pogorelova Yu. A., Kachesova P. S., Goroshinskaya I. A., Kotieva I. M., Morozova M. I., Tumanyan S. V.

Federal State Budgetary Institution «National Medical Research Centre for Oncology» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Rostov-on-Don, Russia, 14 liniya str., 63, 344037

### SUMMARY

Diabetes mellitus (DM) is an independent factor that increases the risk of occurrence and unfavorable course of various malignant tumors. The role of MMP-9 in physiological and pathological processes associated with remodel-



ing and degradation of the cellular matrix is broad and ambiguous. Cortisol is one of the recognized stress markers that induce extensive physiological responses. Male and female outbred white rats were divided into groups: intact animals, induced DM, Guerin's carcinoma, Guerin's carcinoma in presence of DM. Female rats with DM alone and in combination showed 5.0 and 1.5 times lower levels of MMP-9 in the heart than intact animals ( $p < 0.05$ ), while in males, on the contrary, the levels were 1.4 and 1.7 times higher ( $p < 0.05$ ). In the kidneys of females with DM alone and in combination, MMP-9 was 8.5 and 1.8 times lower than in intact animals ( $p < 0.05$ ), while in males it was lower only in animals with Guerin's carcinoma alone by 1.4 times ( $p < 0.05$ ). The levels of cortisol in the heart and kidneys in males and females of the studied groups exceeded the indices in intact animals (in females with DM and DM+Guerin's carcinoma – by 1.5 times ( $p < 0.05$ ) and 3.1 times in the heart and by 2.6 times and 3.1 times in the kidneys; in males – by 1.5 times and 1.4 times ( $p < 0.05$ ) in the heart and by 1.5 times and 1.7 times ( $p < 0.05$ ) in the kidneys). Gender differences in the levels of MMP-9 in rats with studied pathologies could indicate different mechanisms of the development of diabetic complications in the heart and kidney tissues.

**Key words:** diabetes mellitus, Guerin's carcinoma, kidneys, heart, MMP-9, cortisol, rats.

Сахарный диабет (СД) является независимым фактором повышающим риск возникновения различных злокачественных опухолей и неблагоприятным прогностическим фактором течения рака [1]. Для СД характерны инсулинорезистентность, нарушение секреции инсулина, аномальный жировой обмен, чрезмерное производство глюкозы в печени и системное хроническое воспаление, в результате чего СД считается фактором риска сердечно-сосудистых заболеваний, нефропатии, ретинопатии и др. [2]. В крупном международном исследовании было показано, что сердечная недостаточность при СД связана с высоким (двукратным) риском хронической болезни почек, и наоборот, подтверждая тот факт, что многогранные перекрестные помехи образуют порочный круг между нарушениями в сердечно-сосудистой и выделительной системах [3].

Внеклеточный матрикс (ЕСМ) не только играет вспомогательную роль для органов и тканей, но также активно участвует в других функциях, таких как регуляция клеточного цикла и подвижности клеток, выживание и апоптоз, а также распределение факторов роста и интеграция сигналов в клетки. ЕСМ состоит из сотен молекул, включая протеогликаны, гликозаминогликаны, структурные белки, такие как коллаген и эластин, белки адгезии, такие как фибронектин и ламинин, и протеазы, называемые матриксными металлопротеиназами – ММП [4]. ММП участвуют в различных физиологических и патофизиологических процессах, которые регулируются гормонами, факторами роста и цитокинами [5]. Основываясь на субклеточном распределении и специфичности для компонентов ЕСМ, ММП делятся на матриксные металлопротеазы мембранного типа, коллагеназы, желатиназы, стромелизины и матрилизины. Желатиназы, к которым относится ММП-9, участвуют в различных клеточных процессах, включая ангиогенез и нейрогенез. Кроме того, эти протеазы изменяют молекулы базальной пластинки, что впоследствии приводит к гибели клеток [6]. Известно,

что у пациентов с СД постоянная гипергликемия вызывает оксидативный стресс и синтез ММП-9. Это было продемонстрировано на уровне белка, поскольку экспрессия и активность ММП-9 увеличивались как следствие окислительного стресса, возникающего в эндотелиальных клетках сосудов [7]. Появляется все больше доказательств роли ММП-9 в генезе метаболических нарушений, связанных с СД. Исследования *in vivo* показали, что увеличение концентрации и активности ММП-9 в моче пациентов с СД, особенно у пациентов с альбуминурией и установленным повреждением почек [8]. Экспериментальные исследования на грызунах показали ценную информацию о потенциальной роли ММП при поражении почек, продемонстрировав измененную экспрессию и ферментативную активность. При этом ММП могут оказывать как патогенное, так и ренопротекторное действие, более того, одна и та же изоформа ММП может играть обе роли, что подчеркивает сложность патофизиологии данной системы [8].

Кортизол, стероидный гормон, часто используемый в качестве биомаркера стресса, связан как с сердечно-сосудистыми заболеваниями (ССЗ) и сахарным диабетом 2 типа (СД-2), так и со злокачественной патологией. Повышенный уровень кортизола вызывает обширные физиологические реакции, включая мобилизацию энергии (за счет повышения уровня глюкозы в крови с последующим расщеплением белков и жиров) и поддержание гомеостаза (за счет индукции сужения сосудов и удержания натрия [9]. Клинические наблюдения показали повышенную смертность от сердечно-сосудистых заболеваний у пациентов, страдающих синдромом Кушинга, а тот факт, что глюкокортикоидные рецепторы экспрессируются в сердце указывает на то, что избыток кортизола может оказывать прямое воздействие на ткань миокарда [10].

Для изучения патогенеза заболеваний целесообразно проведение экспериментальных исследований с использованием моделей патоло-

гии, а также обязателен анализ с учетом половых особенностей течения заболевания [11, 12].

Целью настоящего исследования явилось изучение уровня ММР-9 и кортизола в сердце и почках крыс с сахарным диабетом, карциномой Герена и при их сочетании.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследование были включены белые нелинейные крысы обоего пола весом 180-220 г, полученные из ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА» (филиал «Андреевка», Московская область), содержащиеся при естественном режиме освещения со свободным доступом к воде и пище. Работа с животными проводилась в соответствии с правилами «Европейской конвенции о защите животных, используемых в экспериментах» (Директива 86/609/ЕЕС), с «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» и приказом Минздрава России от 19 июня 2003 г. № 267 «Об утверждении правил лабораторной практики». Протокол экспериментального исследования был одобрен Комиссией по биоэтике ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России от 01.09.2020, протокол этического комитета №21/99.

Животные каждого пола были разделены на группы по 8 особей: интактные, контрольные группы - аллоксановый СД и рост перевивной карциномы Герена, основная группа - рост перевивной карциномы Герена на фоне аллоксанового СД. Для воспроизведения экспериментального СД животным однократно внутривенно вводили аллоксан в дозе 150 мг/кг веса. Высокое содержание глюкозы в капиллярной крови, в пределах 15-30 ммоль/л свидетель-

ствовало о развитии СД. Карциному Герена перевивали подкожно по 0,5 мл взвеси клеток в физиологическом растворе в разведении 1:5, в основной группе – спустя 1 неделю стойкой гипергликемии. Через 3 дня после введения взвеси штамма карциномы Герена регистрировали подкожный рост опухоли. На момент перевивки карциномы Герена у животных основной группы (n=8) средний показатель глюкозы в крови составил  $25,4 \pm 1,2$  ммоль/л, тогда как у интактных животных (n=8)  $5,2 \pm 0,3$  ммоль/л. Забой животных проводили через 14 дней с помощью гильотины. В 10% гомогенатах сердца и почек методом ИФА определяли содержание ММР-9 (eBioscience, США) и радиоиммунным методом уровень кортизола (Immunotech, Чехия). Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Statistica 10.0 (USA). Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Соответствие распределения нормальному оценивали с помощью критерия Шапиро-Уилка. Значимость различий между независимыми выборками оценивали с помощью критерия Манна-Уитни и t-критерия Стьюдента, для нормального распределения данных. Значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

### РЕЗУЛЬТАТЫ

В исследовании было установлено, что у самок в ткани сердца уровень ММР-9 был ниже по сравнению с показателями интактных животных при СД в самостоятельном варианте в 5,0 раз и в 1,5 раза ( $p < 0,05$ ), при росте злокачественной опухоли на фоне СД. Показатели ММР-9 в сердце при росте карциномы Герена не имел достоверных отличий от показателей у интактных животных (таблица 1).

Таблица 1  
Уровень ММР9 и кортизола в тканях сердца и почек у самок крыс при росте карциномы Герена, СД и сочетании двух патологий

Показатели	Интактные	Карцинома Герена	Сахарный диабет	СД + карцинома Герена
	Сердце			
ММР-9 (нг/г ткани)	$20,5 \pm 1,9$	$17,7 \pm 0,70^2$	$4,1 \pm 0,39^1$	$13,8 \pm 1,1^{1,2}$
Кортизол (нмоль/г ткани)	$6,8 \pm 0,67$	$13,5 \pm 1,2^{1,2}$	$10,1 \pm 0,9^1$	$20,9 \pm 1,9^{1,2}$
Почки				
ММР-9 (нг/г ткани)	$33,9 \pm 3,1$	$8,4 \pm 0,81^{1,2}$	$4,0 \pm 0,04^1$	$19,0 \pm 1,7^{1,2}$
Кортизол (нмоль/г ткани)	$6,9 \pm 0,6^1$	$13,3 \pm 1,1^{1,2}$	$17,9 \pm 1,5^1$	$21,6 \pm 1,9^1$

Примечание. Статистически значимые отличия по сравнению: <sup>1</sup> – с показателями интактной группы; <sup>2</sup> - с показателями при самостоятельном СД; <sup>3</sup> – с показателями при самостоятельном росте карциномы Герена ( $p < 0,05$ )

Следует отметить, что на фоне самостоятельного развивающегося СД уровень ММР-9 в ткани сердца был максимально низким: в 4,3 раза ниже, чем при самостоятельном росте карциномы Герена и в 3,4 раза, по сравнению с ростом злокачественной опухоли на фоне СД. В ткани почек самок при самостоятельном СД уровень ММР-9 был в 8,5 раза ниже показателя у интактных животных, при самостоятельном росте опухоли в 4 раза ниже, и при росте опухоли на фоне СД ниже в 1,8 раза ( $p < 0,05$ ). На фоне низких показателей ММР-9 в тканях сердца и почек уровень кортизола у самок в исследованных образцах оказался выше, чем у интактных животных: при самостоятельном СД в 1,5 раза ( $p < 0,05$ ) и 2,6 раза соответственно, при самостоятельном росте карциномы Герена в 2,0 и 1,9 раза ( $p < 0,05$ ); при росте карциномы на фоне СД в среднем в 3,1 раза. При этом уровень кортизола только в сердце при самостоятельном

СД оказался ниже, в 1,3 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с ростом карциномы Герена и в 2,1 раза, по сравнению с ростом опухоли на фоне СД. В образцах почки уровень кортизола при СД был в 1,3 раза выше ( $p < 0,05$ ), чем при самостоятельном росте карциномы Герена, но не имел значимых отличий, по сравнению с показателями при росте карциномы Герена на фоне СД.

Учитывая литературные данные о половых различиях при СД и росте различных злокачественных опухолей, далее мы провели аналогичные исследования в гомогенатах сердца и почек у самцов крыс. Было установлено (таблица 2), что у самцов в образцах ткани сердца уровень ММР-9 был выше, по сравнению с интактными животными: при самостоятельном росте карциномы Герена в 3,2 раза, при СД в 1,4 раза ( $p < 0,05$ ) и при сочетанном с СД росте злокачественной опухоли в 1,7 раза ( $p < 0,05$ ).

Таблица 2

**Уровень ММР9 и кортизола в тканях сердца и почек у самцов крыс при росте карциномы Герена, СД и сочетании двух патологий**

Показатели	Интактные	Карцинома Герена	Сахарный диабет	СД + карцинома Герена
	Сердце			
ММР-9 (нг/г ткани)	10,2±0,9	33,0±3,2 <sup>1,2</sup>	14,0±1,3 <sup>1,3</sup>	17,1±1,5 <sup>1,3</sup>
Кортизол (нмоль/г ткани)	7,6±0,74	16,9±1,5 <sup>1,2</sup>	11,6±1,0 <sup>1,3</sup>	10,7±0,9 <sup>1,3</sup>
Почки				
ММР-9 (нг/г ткани)	26,8±2,1	18,9±1,6 <sup>1,2</sup>	25,5±2,4 <sup>3</sup>	27,4±2,6 <sup>3</sup>
Кортизол (нмоль/г ткани)	12,5±1,1	25,3±2,4 <sup>1,2</sup>	19,1±1,1 <sup>3</sup>	20,9±1,7 <sup>1,2</sup>

Примечание. Статистически значимые отличия по сравнению: <sup>1</sup> – с показателями интактной группы; <sup>2</sup> – с показателями при самостоятельном СД; <sup>3</sup> – с показателями при самостоятельном росте карциномы Герена ( $p < 0,05$ )

При этом максимальные показатели ММР-9 были отмечены в сердце у животных с самостоятельным ростом карциномы Герена: в 2,4 раза выше чем при СД и в 1,9 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с ростом злокачественной опухоли на фоне СД. В почках у самцов крыс уровень ММР-9 был ниже нормы в 1,4 раза ( $p < 0,05$ ) только в группе с самостоятельным ростом карциномы Герена, при самостоятельном СД и в группе с ростом злокачественной опухоли на фоне СД содержание ММР-9 в почках не имело значимых отличий от показателей у интактных животных. У самцов в образцах сердца был выше уровень кортизола при росте карциномы Герена в 2,2 раза, при СД в 1,5 раза ( $p < 0,05$ ) и при росте злокачественной опухоли на фоне СД в 1,4 раза ( $p < 0,05$ ), по сравнению с интактными самцами. При этом максимальные показатели кортизола

выявлены при самостоятельном росте карциномы Герена: в 1,5 раза выше ( $p < 0,05$ ), чем при СД и в 1,6 раза выше ( $p < 0,05$ ), по сравнению с животными с карциномой Герена, растущей на фоне СД. В почках уровень кортизола был выше нормы при росте карциномы Герена в самостоятельном варианте в 2,0 раза, при СД в 1,5 раза ( $p < 0,05$ ) и при росте опухоли на фоне СД в 1,7 раза ( $p < 0,05$ ). Проведенные исследования в сердце и почках интактных крыс показали наличие половой специфичности содержания ММР-9 и кортизола (таблицы 1,2). В сердце у интактных самок уровень ММР-9 был выше в 2,0 раза, без значимых отличий в содержании кортизола, по сравнению с интактными самцами. В почках интактных самок уровень ММР-9 был выше в 1,3 раза ( $p < 0,05$ ), но кортизола ниже в 1,8 раза ( $p < 0,05$ ), по сравнению с интактными самцами.

## ОБСУЖДЕНИЕ

По прогнозам, число людей с СД во всем мире увеличится с нынешних 463 миллионов до 700 миллионов к 2045 году, а вместе с ним и количество людей, у которых развиваются осложнения, связанные с СД [13]. Появляется все больше свидетельств того, что пол является важным фактором, определяющим эпидемиологию, патофизиологию, лечение и течение при многих заболеваниях, и, по-видимому, особенно актуален для неинфекционных заболеваний, в том числе, СД и рака. Многие организации в настоящее время призывают к включению гендерных аспектов в биомедицинские исследования, чтобы повысить научное качество и социальную значимость производимых знаний, технологий и инноваций [14]. В области эндокринологии наибольшее количество доказательств важных клинических последствий полового диморфизма получено из исследований СД [15].

В настоящем исследовании показано, что изменение содержания ММР-9 у самцов и самок оказалось разнонаправленным: у самок при исследуемых патологических процессах, связанных с СД, уровень ММР-9 был ниже в той или иной степени, по сравнению с показателями у интактных самок, а у самцов, напротив, содержание ММР-9 было выше в аналогичных ситуациях. При самостоятельном росте карциномы Герена в сердце самок содержание ММР-9 не имело достоверных отличий от значений у интактных животных, а у самцов установлено значительное увеличение ее уровня.

Экспериментальные исследования Euler G. с соавторами показали, что у крыс с гипертензией (SHR), у которых развилась гипертрофия сердца, наблюдали подавление мРНК ММР-9, в то время как мРНК ММР-2 сохранялась. Это хорошо согласуется с наблюдением, что ММР-9 подавляется при стимуляции адренорецепторов в кардиомиоцитах. Снижение уровня ММР-9 при стимуляции гипертрофического роста кардиомиоцитов указывает на то, что подавление ММР может быть функционально вовлечено в процесс гипертрофического роста кардиомиоцитов. Действительно, показано, что ингибиторы ММР вызывают гипертрофический рост изолированных кардиомиоцитов, независимо от других дополнительных гипертрофических стимулов [16].

Из результатов нашего исследования очевидно, что механизмы поражения сердечной мышцы у животных имеют половые различия. Вероятно, у самок диабетическая кардиомиопатия может быть связана с гипертрофическим ростом кардиомиоцитов, тогда как у самцов – с дегра-

дией внеклеточного матрикса. Исследования показывают, что существуют половые различия во взаимосвязи между СД и смертностью от сердечно-сосудистых заболеваний. Несколько исследований продемонстрировали повышенный относительный риск сердечно-сосудистых заболеваний у женщин с СД по сравнению с мужчинами при СД как 1-го, так и 2-го типа [17]. Точные патофизиологические механизмы остаются недостаточно изученными и требуют дальнейших исследований, но более высокий риск, по-видимому, обусловлен биологическими, экологическими и поведенческими факторами [18]. Обсуждаемые биологические причины включают потерю защитного гормонального эффекта женскими половыми гормонами и дисбаланс половых гормонов в условиях гипергликемии, приводящий к более высокому окислительному стрессу и эндотелиальной дисфункции, провоспалительной среде, влияющей на действие рецепторов эстрогенов, модуляции сосудистой реакции на оксид азота и нарушению релаксационных свойств сосудов [18].

Различия в изменении уровня ММР-9 в ткани почек найдены нами при развитии карциномы Герена на фоне сахарного диабета и при СД в самостоятельном варианте у самок и самцов крыс. Результаты показывают, что у самок контрольных и основной групп, с разной степенью выраженности изменений в почках уровень ММР-9 был ниже, чем у интактных животных, в то же время, у самцов низкое содержание ММР-9 установлено только в группе животных с карциномой Герена в самостоятельном варианте.

Традиционно считается, что гипергликемия подавляет экспрессию и активность ММР у пациентов с диабетической нефропатией (ДН), в результате снижается деградация и накопление внутриклеточного матрикса, что ведет к мезангиальному расширению с развитием поражений Киммелштиля-Вильсона. Хорошо известно, что окружающая среда с высоким содержанием глюкозы отрицательно влияет на деградацию или обмен и ферментативную активность металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов у пациентов с ДН [19]. Авторы показали, что развитие СД было связано со снижением мРНК и ферментативной активности ММР-9 (21% и 51% соответственно,  $p < 0,05$  по сравнению с контролем). Эти результаты показывают, что нарушение деградации матрикса способствует его накоплению при ДН.

Кортизол, стероидный гормон, являющийся биомаркером стресса, связан с сердечно-сосудистыми заболеваниями (ССЗ) и СД [9]. Было обнаружено, что более высокое соотношение кортизола к тестостерону в плазме коррелировало с

заболеваемостью и смертностью от ишемической болезни сердца (ИБС), но эта связь может быть опосредована факторами риска сердечно-сосудистых заболеваний. Кортизол также был положительно связан с использованием сердечно-сосудистых препаратов и сахарным диабетом [20].

В настоящем исследовании показано, что уровень кортизола в ткани сердца и почек самок и самцов был повышен во всех исследуемых образцах.

Установлено, что гиперкортизолизм связан с различными заболеваниями, включая СД, ожирение, гипертензию, дислипидемию, остеопороз, артериосклероз и сердечно-сосудистые заболевания. Распространенность гиперкортизолизма выше у пациентов с СД, чем в общей популяции [21]. Было обнаружено, что уровень кортизола положительно коррелировал с гликированным гемоглобулином (HbA1c), независимо от противодиабетических препаратов [21]. Однако результаты относительно взаимосвязи кортизола и кардиометаболических компонентов противоречивы [22].

В нескольких исследованиях установлено, что секреция кортизола коррелирует как с традиционными кардиометаболическими факторами, так и с функцией почек [23]. Понятно, что уровень кортизола обоснованно связан с наличием СД в двух группах животных – СД и СД+карцинома Герена, вместе с тем увеличение его уровня в группе самок и самцов с карциномой Герена требует дальнейшего изучения.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, повышение уровня кортизола в мишенях диабетических осложнений – в сердце и почках у самок и самцов крыс указывает на стрессорный характер воздействия опухолевого роста карциномы Герена, СД и их комбинации на эти органы. При этом, половые различия в содержании ММР-9 при исследованных патологиях могут свидетельствовать о разных механизмах развития диабетических осложнений в ткани сердца и почек, их сопровождающих.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors have no conflict of interests to declare.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Harding J.L., Andes L.J., Gregg E.W., Cheng Y.J., Weir H.K., Bullard K.M., Burrows N.R., Imperatore G. Trends in cancer mortality among people with vs. without diabetes in the USA, 1988–2015. *Diabetologia*. 2020;63:75–84. doi: 10.1007/s00125-019-04991-x.
2. Peeters S.A., Engelen L., Buijs J., Chaturvedi N., Fuller J.H., Jorsal A., Parving H.H., Tarnow L., Theilade S., Rossing P., et al. Circulating matrix metalloproteinases are associated with arterial stiffness in patients with type 1 diabetes: Pooled analysis of three cohort studies. *Cardiovasc. Diabetol.* 2017;16:139. doi: 10.1186/s12933-017-0620-9.
3. Birkeland K.I., Bodegard J., Eriksson J.W., Norhammar A., Haller H., Linssen G.C.M., Banerjee A., Thuresson M., Okami S., Garal-Pantaler E., Overbeek J., Mamza J.B., Zhang R., Yajima T., Komuro I., Kadowaki T. Heart failure and chronic kidney disease manifestation and mortality risk associations in type 2 diabetes: A large multinational cohort study. *Diabetes Obes Metab.* 2020;22(9):1607-1618. doi: 10.1111/dom.14074.
4. Cui N., Hu M., Khalil R.A. Biochemical and biological attributes of matrix metalloproteinases. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 2017;147:1–73. doi: 10.1016/bs.pmbts.2017.02.005.
5. Kapoor C., Vaidya S., Wadhwan V., Kaur G., Pathak A. Seesaw of matrix metalloproteinases (MMPs) J. *Cancer Res. Ther.* 2016;12:28–35. doi: 10.4103/0973-1482.157337.
6. Watson C., Spiers J.P., Waterstone M., Russell-Hallinan A., Gallagher J., McDonald K., Ryan C., Gilmer J., Ledwidge, M. (2021). Investigation of association of genetic variant rs3918242 of matrix metalloproteinase-9 with hypertension, myocardial infarction and progression of ventricular dysfunction in Irish Caucasian patients with diabetes: a report from the STOP-HF follow-up programme. *BMC cardiovascular disorders.* 2021;21(1):87. doi: 10.1186/s12872-021-01860-7.
7. Uemura S., Matsushita H., Li W., Glassford A.J., Asagami T., Lee K.H., Harrison D.G., Tsao P.S. Diabetes mellitus enhances vascular matrix metalloproteinase activity: Role of oxidative stress. *Circ. Res.* 2001;88:1291–1298. doi: 10.1161/hh1201.092042.
8. Garcia-Fernandez N., Jacobs-Cacha C., Mora-Gutierrez J.M., Vergara A., Orbe J., Soler M.J. Matrix Metalloproteinases in Diabetic Kidney Disease. *J. Clin. Med.* 2020;9:472. doi: 10.3390/jcm9020472.
9. Kwok M.K., Kawachi I., Rehkopf D., Schooling C.M. The role of cortisol in ischemic heart disease, ischemic stroke, type 2 diabetes, and cardiovascular disease risk factors: a bi-directional Mendelian randomization study. *BMC Med.* 2020;18(1):363. doi: 10.1186/s12916-020-01831-3.
10. Wolf P., Winhofer Y., Krššák M., Krebs M. Heart, lipids and hormones. *Endocr Connect* 2017;6:R59-69. doi: <https://doi.org/10.1530/EC-17-0031>.
11. Кит О.И., Франциянц Е.М., Каплиева И.В., Трепитаки Л.К., Евстратова О.Ф. Способ получения метастазов печени в эксперименте. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2014;157(6):745-747.
12. Жукова Г.В., Шихлярова А.И., Сагакянц А.Б., Протасова Т.П. О расширении вариантов использования мышей BALB/c nude для экспериментального изучения злокачественных опухолей человека in vivo. *Юж-*

но-российский онкологический журнал. 2020;1(2):28-35. doi: org/10.37748/2687-0533-2020-1-2-4.

13. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas 9th Edition 2019 Available from: <https://www.diabetesatlas.org/en/>. Accessed 30 Jan 2020.

14. Schiebinger L., Klinge I., Sánchez de Madariaga I., Paik H.Y., Schraudner M., Stefanick M. Gendered innovations in science, health, medicine, engineering and environment. Available at [genderedinnovations.stanford.edu/what-is-gendered-innovations.html](http://genderedinnovations.stanford.edu/what-is-gendered-innovations.html). Accessed January 2011;21:2015.

15. Harreiter J., Fadl H., Kautzky-Willer A., Simmons D. Do Women with Diabetes Need More Intensive Action for Cardiovascular Reduction than Men with Diabetes? Current diabetes reports. 2020;20(11):61. <https://doi.org/10.1007/s11892-020-01348-2>.

16. Euler G., Locquet F., Kociszewska J., Osygus Y., Heger J., Schreckenberger R., Schlüter K. D., Kenyeres É., Szabados T., Bencsik P., Ferdinandy P., Schulz R. Matrix Metalloproteinases Repress Hypertrophic Growth in Cardiac Myocytes. Cardiovascular drugs and therapy. 2021;35(2):353–365. <https://doi.org/10.1007/s10557-020-07138-y>.

17. Clemens K.K., Woodward M., Neal B., Zinman B. Sex Disparities in cardiovascular outcome trials of populations with diabetes: a systematic review and meta-analysis. Diabetes Care. 2020;43(5):1157–1163.

18. Kautzky-Willer A., Harreiter J., Pacini G. Sex and Gender Differences in Risk, Pathophysiology and Complications of Type 2 Diabetes Mellitus. Endocrine reviews. 2016;37(3):278–316. <https://doi.org/10.1210/er.2015-1137>.

19. McLennan S.V., Kelly D.J., Cox A.J., Cao Z., Lyons J.G., Yue D.K., Gilbert R.E. Decreased matrix degradation in diabetic nephropathy: effects of ACE inhibition on the expression and activities of matrix metalloproteinases. Diabetologia. 2002;45(2):268-275. doi: 10.1007/s00125-001-0730-4.

20. Abell J.G., Stalder T., Ferrie J.E., Shipley M.J., Kirschbaum C., Kivimaki M., Kumari M. Assessing cortisol from hair samples in a large observational cohort: the Whitehall II study. Psychoneuroendocrinology. 2016;73:148–156. doi: 10.1016/j.psyneuen.2016.07.214.

21. Steffensen C., Dekkers O.M., Lyhne J., Pedersen B.G., Rasmussen F., Rungby J., Poulsen P.L., Jørgensen J.O.L. Hypercortisolism in newly diagnosed type 2 diabetes: A prospective study of 384 newly diagnosed patients. Horm Metab Res. 2019;51:62–68. doi: 10.1055/a-0809-3647.

22. Zhang X., Deng X., Zhou J., Qiu K., Deng M., Lin Z., Mosha S. S., Li W. The Association Of Serum Cortisol Level With Microalbuminuria In Patients With Type 2 Diabetes And Prediabetes. International journal of medical sciences. 2020;17(18):2998–3004. <https://doi.org/10.7150/ijms.48742>.

23. Li X., Xiang X., Hu J., Goswami R., Yang S., Zhang A., Wang Y., Li Q., Bi X. Association Between

Serum Cortisol and Chronic Kidney Disease in Patients with Essential Hypertension. Kidney Blood Press Res. 2016;41(4):384–391. doi:org/10.1159/000443435.

## REFERENCES

1. Harding J.L., Andes L.J., Gregg E.W., Cheng Y.J., Weir H.K., Bullard K.M., Burrows N.R., Imperatore G. Trends in cancer mortality among people with vs. without diabetes in the USA, 1988–2015. Diabetologia. 2020;63:75–84. doi: 10.1007/s00125-019-04991-x.

2. Peeters S.A., Engelen L., Buijs J., Chaturvedi N., Fuller J.H., Jorsal A., Parving H.H., Tarnow L., Theilade S., Rossing P., et al. Circulating matrix metalloproteinases are associated with arterial stiffness in patients with type 1 diabetes: Pooled analysis of three cohort studies. Cardiovasc. Diabetol. 2017;16:139. doi: 10.1186/s12933-017-0620-9.

3. Birkeland K.I., Bodegard J., Eriksson J.W., Norhammar A., Haller H., Linssen G.C.M., Banerjee A., Thuresson M., Okami S., Garal-Pantaler E., Overbeek J., Mamza J.B., Zhang R., Yajima T., Komuro I., Kadowaki T. Heart failure and chronic kidney disease manifestation and mortality risk associations in type 2 diabetes: A large multinational cohort study. Diabetes Obes Metab. 2020;22(9):1607-1618. doi: 10.1111/dom.14074.

4. Cui N., Hu M., Khalil R.A. Biochemical and biological attributes of matrix metalloproteinases. Prog. Mol. Biol. Transl. Sci. 2017;147:1–73. doi: 10.1016/bs.pmbts.2017.02.005.

5. Kapoor C., Vaidya S., Wadhwan V., Kaur G., Pathak A. Seesaw of matrix metalloproteinases (MMPs) J. Cancer Res. Ther. 2016;12:28–35. doi: 10.4103/0973-1482.157337.

6. Watson C., Spiers J.P., Waterstone M., Russell-Hallinan A., Gallagher J., McDonald K., Ryan C., Gilmer J., Ledwidge, M. (2021). Investigation of association of genetic variant rs3918242 of matrix metalloproteinase-9 with hypertension, myocardial infarction and progression of ventricular dysfunction in Irish Caucasian patients with diabetes: a report from the STOP-HF follow-up programme. BMC cardiovascular disorders. 2021;21(1):87. doi: 10.1186/s12872-021-01860-7.

7. Uemura S., Matsushita H., Li W., Glassford A.J., Asagami T., Lee K.H., Harrison D.G., Tsao P.S. Diabetes mellitus enhances vascular matrix metalloproteinase activity: Role of oxidative stress. Circ. Res. 2001;88:1291–1298. doi: 10.1161/hh1201.092042.

8. Garcia-Fernandez N., Jacobs-Cacha C., Mora-Gutierrez J.M., Vergara A., Orbe J., Soler M.J. Matrix Metalloproteinases in Diabetic Kidney Disease. J. Clin. Med. 2020;9:472. doi: 10.3390/jcm9020472.

9. Kwok M.K., Kawachi I., Rehkopf D., Schooling C.M. The role of cortisol in ischemic heart disease, ischemic stroke, type 2 diabetes, and cardiovascular disease risk factors: a bi-directional Mendelian randomization study. BMC Med. 2020;18(1):363. doi: 10.1186/s12916-020-01831-3.

10. Wolf P., Winhofer Y., Krššák M., Krebs M. Heart, lipids and hormones. *Endocr Connect* 2017;6:R59-69. doi: <https://doi.org/10.1530/EC-17-0031>.
11. Kit O.I., Frantsiyants E.M., Kaplieva I.V., Trepitaki L.K., Evstratova O.F. A method for obtaining liver metastases in an experiment. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2014;157(6):745-747 (in Russian).
12. Zhukova G.V., Shikhlyarova A.I., Sagakyants A.B., Protasova T.P. Expanding the use of BALB / cnude mice for experimental study of human malignant tumors in vivo. *Yuzhno-rossiyskiy onkologicheskiy zhurnal*. 2020;1(2):28-35 (in Russian). doi: [org/10.37748/2687-0533-2020-1-2-4](https://doi.org/10.37748/2687-0533-2020-1-2-4).
13. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas 9th Edition 2019 Available from: <https://www.diabetesatlas.org/en/>. Accessed 30 Jan 2020.
14. Schiebinger L., Klinge I., Sánchez de Madariaga I., Paik H.Y., Schraudner M., Stefanick M. Gendered innovations in science, health, medicine, engineering and environment. Available at [genderedinnovations.stanford.edu/what-is-gendered-innovations.html](https://genderedinnovations.stanford.edu/what-is-gendered-innovations.html). Accessed January 2011;21:2015.
15. Harreiter J., Fadl H., Kautzky-Willer A., Simmons D. Do Women with Diabetes Need More Intensive Action for Cardiovascular Reduction than Men with Diabetes? *Current diabetes reports*. 2020;20(11):61. <https://doi.org/10.1007/s11892-020-01348-2>.
16. Euler G., Locquet F., Kociszewska J., Osygus Y., Heger J., Schreckenberger R., Schlüter K. D., Kenyeres É., Szabados T., Bencsik P., Ferdinandy P., Schulz R. Matrix Metalloproteinases Repress Hypertrophic Growth in Cardiac Myocytes. *Cardiovascular drugs and therapy*. 2021;35(2):353–365. <https://doi.org/10.1007/s10557-020-07138-y>.
17. Clemens K.K., Woodward M., Neal B., Zinman B. Sex Disparities in cardiovascular outcome trials of populations with diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care*. 2020;43(5):1157–1163.
18. Kautzky-Willer A., Harreiter J., Pacini G. Sex and Gender Differences in Risk, Pathophysiology and Complications of Type 2 Diabetes Mellitus. *Endocrine reviews*. 2016;37(3):278–316. <https://doi.org/10.1210/er.2015-1137>.
19. McLennan S.V., Kelly D.J., Cox A.J., Cao Z., Lyons J.G., Yue D.K., Gilbert R.E. Decreased matrix degradation in diabetic nephropathy: effects of ACE inhibition on the expression and activities of matrix metalloproteinases. *Diabetologia*. 2002;45(2):268-275. doi: [10.1007/s00125-001-0730-4](https://doi.org/10.1007/s00125-001-0730-4).
20. Abell J.G., Stalder T., Ferrie J.E., Shipley M.J., Kirschbaum C., Kivimaki M., Kumari M. Assessing cortisol from hair samples in a large observational cohort: the Whitehall II study. *Psychoneuroendocrinology*. 2016;73:148–156. doi: [10.1016/j.psyneuen.2016.07.214](https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2016.07.214).
21. Steffensen C., Dekkers O.M., Lyhne J., Pedersen B.G., Rasmussen F., Rungby J., Poulsen P.L., Jørgensen J.O.L. Hypercortisolism in newly diagnosed type 2 diabetes: A prospective study of 384 newly diagnosed patients. *Horm Metab Res*. 2019;51:62–68. doi: [10.1055/a-0809-3647](https://doi.org/10.1055/a-0809-3647).
22. Zhang X., Deng X., Zhou J., Qiu K., Deng M., Lin Z., Mosha S. S., Li W. The Association Of Serum Cortisol Level With Microalbuminuria In Patients With Type 2 Diabetes And Prediabetes. *International journal of medical sciences*. 2020;17(18):2998–3004. <https://doi.org/10.7150/ijms.48742>.
23. Li X., Xiang X., Hu J., Goswami R., Yang S., Zhang A., Wang Y., Li Q., Bi X. Association Between Serum Cortisol and Chronic Kidney Disease in Patients with Essential Hypertension. *Kidney Blood Press Res*. 2016;41(4):384–391. doi: [org/10.1159/000443435](https://doi.org/10.1159/000443435).

## ВЛИЯНИЕ MMP-9 НА РОСТ И РАЗВИТИЕ ПЕРВИЧНО-МНОЖЕСТВЕННЫХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ В УСЛОВИЯХ ПЕРВИЧНОГО ИММУНОДЕФИЦИТА

**Франциянц Е. М., Каплиева И. В., Трепитаки Л. К., Сурикова Е. И., Бандовкина В. А., Нескубина И. В., Погорелова Ю. А., Черярина Н. Д., Котиева И. М., Шумарин К. А.**

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 344037, ул. 14 линия, 63, Ростовская обл., г. Ростов-на-Дону, Россия

**Для корреспонденции:** Черярина Наталья Дмитриевна, врач-лаборант ЛИПЗО ФГБУ «НМИЦ онкологии» МЗ РФ, e-mail: scalolas.92@yandex.ru

**For correspondence:** Cheryarina Natalia D., laboratory assistant at Laboratory of Malignant Tumor Pathogenesis Study, National Medical Research Centre for Oncology of the Ministry of Health of Russia, e-mail: scalolas.92@yandex.ru

### Information about authors:

**Frantsiyants E. M.**, <http://orcid.org/0000-0003-3618-6890>

**Kaplieva I. V.**, <http://orcid.org/0000-0002-3972-2452>

**Trepitaki L. K.**, <http://orcid.org/0000-0002-9749-2747>

**Surikova E. I.**, <http://orcid.org/0000-0002-4318-7587>

**Bandovkina V. A.**, <http://orcid.org/0000-0002-2302-8271>

**Neskubina I. V.**, <https://orcid.org/0000-0002-7395-3086>

**Pogorelova Yu. A.**, <http://orcid.org/0000-0002-2674-9832>

**Cheryarina N. D.**, <http://orcid.org/0000-0002-3711-8155>

**Kotieva I. M.**, <https://orcid.org/0000-0003-0252-4708>

**Shumarin K. A.**, <http://orcid.org/0000-0003-4362-9303>

### РЕЗЮМЕ

MMP-9 глубоко вовлечена не только в инвазию и метастазирование, но и в ангиогенез различных опухолей, а также может влиять на микроокружение опухолей. Целью настоящего исследования явилось изучение уровней MMP-9 в ткани меланомы B16/F10 и карциномы лёгкого Льюиса при самостоятельном и сочетанном вариантах их роста. В качестве коморбидной патологии был выбран первичный иммунодефицит, моделью которого являются мыши Balb/c Nude. Работа выполнена на 24 самках, которые были разделены на группы по 6 особей в каждой: 1 – интактные, 2 – изолированный рост меланомы B16/F10, 3 – изолированный рост карциномы лёгкого Льюиса (LLC); 4 – сочетанный рост B16/F10 и LLC – первично-множественные злокачественные опухоли (ПМЗО). В гомогенатах ткани опухоли и ее перифокальной зоны у животных всех групп методом ИФА определяли содержание MMP-9. Выявлено, что при ПМЗО уровень MMP-9 в ткани опухоли B16/F10 был в 3,9 раза выше, чем в опухоли LLC. При ПМЗО уровень MMP-9 в ткани перифокальной зоны B16/F10 был в 1,9 раза выше, чем в перифокальной зоне LLC. При сочетанном варианте в ткани кожи, не затронутой злокачественным процессом, уровень MMP-9 был выше, чем показатель в интактной коже в среднем в 2,8 раза. При ПМЗО уровень MMP-9 в опухолевых образцах имел положительную корреляцию с объемами первичных узлов. Каким бы ни был уровень MMP-9 в ткани опухоли и ее перифокальной зоне, ясно, что она непосредственно участвует в развитии опухолевой болезни.

**Ключевые слова:** меланома B16/F10, карцинома лёгкого Льюиса, сочетанный вариант роста, MMP-9, эксперимент.

### EFFECT OF MMP9 ON GROWTH AND DEVELOPMENT OF EXPERIMENTAL MULTIPLE PRIMARY TUMORS IN PRIMARY IMMUNODEFICIENCY

**Frantsiyants E. M., Kaplieva I. V., Trepitaki L. K., Surikova E. I., Bandovkina V. A., Neskubina I. V., Pogorelova Yu. A., Cheryarina N. D., Kotieva I. M., Shumarin K. A.**

National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don, Russia

### SUMMARY

MMP9 is deeply involved in invasion, metastasis and angiogenesis of various tumors, and can also affect the tumor microenvironment. The aim of this study was to analyze the MMP9 levels in tissues with independent and combined growth (MPT): B16/F10 melanoma and Lewis lung carcinoma. Primary immunodeficiency presented in a model of Balb/c Nude mice was chosen as a comorbid pathology. The study included 24 females divided into groups (n=6 each): 1 – intact animals, 2 – animals with B16/F10 melanoma, 3 – animals with Lewis lung carcinoma (LLC), 4 - animals with a combination of B16/F10 and LLC - multiple primary malignancies (MPMs). Levels of MMP9 were measured by ELISA in homogenates of tumor and perifocal tissues in all animals. In animals with MPT, levels of MMP9 in B16/F10 were 3.9 times higher than in LLC, and the levels in B16/F10 perifocal tissues were 1.9 times higher than in LLC



perifocal tissues. MMP9 in non-cancer tissues in animals with MPT 2.8 times exceeded the levels in intact animals. In animals with MPT, MMP9 in tumor samples positively correlated with the primary node volumes. Whatever the level of MMP9 in the tumor and perifocal tissues, it is clearly directly involved in cancer development.

**Key words:** B16/F10 melanoma, Lewis lung carcinoma, multiple primary tumors, MMP9, experiment.

Матриксные металлопротеиназы (ММП) представляют собой цинк-зависимые эндопептидазы, которые могут участвовать в протеолизе и могут расщеплять несколько компонентов внеклеточного матрикса (ЕСМ) и молекулы, не относящиеся к ЕСМ [1; 2]. Недавние исследования показали, что помимо деградации различных белковых компонентов внеклеточного матрикса, некоторые ММП, такие как ММП-2, ММП-3, ММП-9 и ММП-14 могут индуцировать эпителиально-мезенхимальный переход или связанные с ним процессы [3]. Среди них ММП-9, также известная как желатиназа В, является одной из ключевых протеаз для деградации ЕСМ и базальной мембраны и играет решающую роль в возникновении и развитии злокачественных опухолей, инвазии и метастазировании, а также ангиогенезе [4]. Она может регулировать структуру ЕСМ, разрезая и разрушая множество белков внеклеточного матрикса посредством гидролиза протеазой [5]. Кроме того, ММП-9 способна специфически разрезать внеклеточный домен на поверхности определенных клеточных белков, чтобы высвободить их из плазматической мембраны, а некоторые пептиды также могут расщепляться под действием ММП-9 вне клетки [6]. Базальная мембрана содержит коллаген, такой как коллаген IV типа, поэтому он может расщепляться ММП-9 [7]. Во время развития опухоли разрушение базальной мембраны часто является важным этапом для достижения инвазии и метастазирования. Следовательно, ММП-9 может воздействовать на процесс эпителиально-мезенхимального перехода опухолевых клеток и может быть незаменимой мишенью для лечения заболеваний. Например, исследования показали, что ММП-9 глубоко вовлечена в инвазию, метастазирование и ангиогенез различных опухолей и может опосредовать микроокружение опухоли [8; 9]. Вместе с тем, в исследовании [10] продемонстрированы ранее неизвестные эффекты ММП-9 на врожденный противоопухолевый иммунитет. Перенос аденовирусом встроенного человеческого гена ММП-9 вызвал дозозависимую массивную инфильтрацию нейтрофилов в ткань рака молочной железы, что привело к снижению роста опухоли и ангиогенезу эксплантатов рака молочной железы у голых мышей и иммунокомпетентных мышей с раком молочной железы. Когда нейтрофилы были истощены обработкой Ad, терапевтический эффект AdMMP-9 исчез.

Авторы продемонстрировали несколько механизмов, с помощью которых AdMMP-9 проявляет противоопухолевые свойства как на иммунодефицитных, так и на иммунокомпетентных мышинных моделях рака груди человека. Для выяснения роли ММП-9 в канцерогенезе кожи было исследовано влияние дефицита ММП-9 на мышинной модели рака кожи K14-HPV16 [11]. У мышей с нокаутом гена ММП-9 развивались неопластические поражения и плоскоклеточные карциномы в более поздние сроки, чем у мышей с гетерозиготой Mmp9 или мышей дикого типа. Хотя в присутствии ММП-9 развивалось большее количество опухолей, они имели менее агрессивный фенотип, что позволяет предположить, что ММП-9 может защищать от прогрессирования опухоли, а не способствовать её развитию. Анализ опухолей контрольных мышей показал, что ММП-9 преимущественно экспрессируется в строме опухоли тучными клетками, нейтрофилами и макрофагами. Понимание молекулярных механизмов этого сложного взаимодействия между злокачественными клетками и окружающей незлокачественной стромой представляет собой одну из основных проблем в исследованиях рака [12; 13; 14].

Первично-множественные злокачественные опухоли (ПМЗО) в настоящее время являются актуальной проблемой онкологии. ПМЗО представляют собой новые первичные опухоли с различным гистогенезом, которые можно легко проверить с помощью иммуногистохимического исследования. Механизмы возникновения ПМЗО и коморбидные заболевания, способствующие их развитию, до конца не изучены. Одним из факторов, способствующим развитию первично-множественных злокачественных опухолей может являться угнетение работы иммунной системы.

Целью настоящего исследования явилось изучение уровней ММП-9 в ткани меланомы B16/F10 и карциномы лёгкого Льюиса при самостоятельном и сочетанном варианте их роста у мышей с первичным иммунодефицитом.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В качестве коморбидной патологии был выбран первичный иммунодефицит, моделью которого являются мыши Balb/c Nude. Работа выполнена на самках (n=24) массой 16-18 г, полученных из питомника лабораторных живот-

ных «Пушино» Филиала Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова (Московская область). В работе использовали опухолевые штаммы мышшиной меланомы B16/F10 и карциномы Льюиса, полученные из РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН (г. Москва). Все животные содержались при естественном режиме освещения со свободным доступом к воде и пище. Работа с животными проводилась в соответствии с правилами «Европейской конвенции о защите животных, используемых в экспериментах» (Директива 86/609/ЕЕС), с «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» и приказом Минздрава России от 19 июня 2003 г. № 267 «Об утверждении правил лабораторной практики». Протокол экспериментального исследования был одобрен Комиссией по биоэтике ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России от 01.09.2020, протокол этического комитета №21/99.

Животные были разделены на группы по 6 особей в каждой: 1 – интактные, 2 – изолированный рост меланомы B16/F10, 3 – изолированный рост опухоли Льюиса (LLC); 4 – сочетанный рост B16/F10 и LLC. Мышам 4 – основной группы последовательно проводили трансплантацию опухолевых клеток: под кожу спины чуть ниже угла правой лопатки вводили 0,5 мл взвеси опухолевых клеток B16/F10 в физиологическом растворе в разведении 1:20, с другой стороны – чуть ниже угла левой лопатки подкожно вводили 0,5 мл опухолевой взвеси LLC, содержащей 0,5 млн. опухолевых клеток. В экспериментальных группах 2 и 3 – для роста опухолей в изолированном варианте, оба штамма трансплантировали разным животным в той же дозе и объёме, что и в группе с ПМЗО под кожу спины чуть ниже угла правой лопатки. На животных линии BALB/c, которые являются общепринятой контрольной моделью для мышей Balb/c Nude, используемые в эксперименте штаммы злокачественных опухолей, ни в самостоятельном, ни в сочетании вариантах не воспроизводились. Этот факт являлся доказательством роли первичного иммунодефицита в возникновении и развитии злокачественных новообразований.

Замеры опухолевого узла проводили в 3 взаимно перпендикулярных направлениях, произведение которых представляло собой объем опухолевого узла. Животных декапитировали. В гомогенатах ткани опухоли и ее перифокальной зоны (0,5 см от видимого края новообразования) у животных всех групп методом ИФА определяли содержание MMP-9 (eBioscience, США), на анализаторе Infiniti F50 TECAN (Австрия).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Statistica 10.0. Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Соответствие распределения нормальному оценивали с помощью критерия Шапиро-Уилка. Значимость различий между независимыми выборками оценивали с помощью t-критерия Стьюдента и критерия Манна-Уитни. Корреляционный анализ проводили с помощью критерия Спирмена. Значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты изучения уровня MMP-9 в различных тканях мышей-самок представлены в таблице 1. Установлено, что при самостоятельном варианте роста уровень MMP-9 в ткани опухоли B16/F10 не имел статистически значимых отличий от показателя в ткани опухоли LLC.

При ПМЗО уровень MMP-9 в ткани опухоли B16/F10 был 3,9 раза выше, чем в опухоли LLC (таблица 1). Интересно, что прослеживается явная корреляционная связь между объемом опухоли (таблица 2) и уровнем MMP-9 в ткани опухоли для меланомы B16/F10 и LLC при сочетании их роста  $r = 0,83$ ,  $p < 0,05$  и  $r = 0,85$ ,  $p < 0,05$  соответственно.

В ткани кожи, не затронутой злокачественным процессом, при самостоятельном варианте роста B16 и LLC уровень MMP-9 был в 4,1 раза и 2,4 раза соответственно выше, чем показатель в коже интактных мышей, а при сочетании варианте – в среднем в 2,8 раза. При этом, уровень MMP-9 в ткани не затронутой злокачественным процессом кожи при самостоятельном варианте роста B16 был в 1,5 раза ( $p < 0,05$ ) выше, чем при сочетании, в ткани не затронутой злокачественным процессом кожи при LLC значения не имели достоверных отличий.

В ткани перифокальной зоны при самостоятельном варианте роста B16 уровень MMP-9 был в 1,9 раза ( $p < 0,05$ ) выше, чем в интактной ткани, но в 2,2 раза и 1,5 раза ( $p < 0,05$ ) соответственно ниже, чем в ткани не затронутой злокачественным процессом кожи при самостоятельном и сочетании варианте роста опухоли. В ткани перифокальной зоны при самостоятельном варианте роста LLC уровень MMP-9 был выше: в 5,5 раза, чем в интактной ткани, в 2,3 раза и 1,9 раза соответственно, чем в ткани не затронутой злокачественным процессом кожи при самостоятельном и сочетании варианте роста опухоли. При этом уровень MMP-9 в перифокальной зоне опухоли при самостоятельном варианте роста B16 и LLC был выше, чем в ткани опухоли в 1,9 раза и 6,7 раза соответственно.

Таблица 1  
Содержание ММР-9 в коже, опухоли и ее перифокальной зоне у самок мышей Balb/c Nude

показатель	кожа			изолированный рост опухоли		ПМЗО	
	интактная	при изолированном росте	при ПМЗО	опухоль	перифокальная зона	опухоль	перифокальная зона
ММР-9	4,8±0,5	B16/F10					
		19,5±2,1 <sup>1,3</sup>	13,4±1,3 <sup>1,2</sup>	4,8±0,6	9,0±1,0 <sup>1,3</sup>	6,7±0,5 <sup>1,2,3</sup>	4,1±0,6 <sup>2,3</sup>
		LLC					
		11,3±1,5 <sup>1</sup>	13,5±1,7 <sup>1</sup>	3,9±0,5	26,2±2,4 <sup>1</sup>	1,7±0,2 <sup>1,2</sup>	2,2±0,3 <sup>1,2</sup>

Примечание: <sup>1</sup> – статистически значимо по отношению к показателю в интактной коже; <sup>2</sup> – статистически значимо по отношению к показателю при одиночном варианте роста; <sup>3</sup> – статистически значимо по отношению к показателю в LLC

Таблица 2  
Объем опухолей и продолжительность жизни мышей самок Balb/c Nude с ПМЗО

Показатели	B16/F10	LLC	ПМЗО	
			B16/F10	LLC
V опухолей на 22 сутки, см <sup>3</sup>	3,90±1,96	4,74±1,08	6,89±1,94*	2,03±0,21+1
количество животных с метастазами	100%	-	30%	-
продолжительность жизни, сутки	26,00±0,58	28,67±0,33	22,67±0,88*,+	

Примечание: \* – значимость отличий по сравнению с изолированным ростом меланомы, + – значимость отличий по сравнению с изолированным ростом карциномы Льюиса, 1 – значимость отличий карцинома Льюиса от меланомы в модели ПМЗО

В ткани перифокальной зоны при сочетанном варианте роста B16 уровень ММР-9 не имел достоверных отличий от показателя в интактной ткани, но был в 4,8 раза и 3,3 раза соответственно ниже, чем в ткани не затронутой злокачественным процессом кожи при самостоятельном и сочетанном варианте роста опухоли. В ткани перифокальной зоны при сочетанном варианте роста LLC уровень ММР-9 был ниже: в 2,2 раза, чем в интактной ткани, и в 5,1 раза и 6,1 раза соответственно, чем в ткани не затронутой злокачественным процессом кожи при самостоятельном и сочетанном варианте роста этой опухоли. При этом уровень ММР-9 в перифокальной зоне B16 при сочетанном варианте роста был ниже, чем в ткани опухоли в 1,6 раза ( $p < 0,05$ ) и не имел достоверных отличий при LLC.

### ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящем исследовании, прежде всего, обращало внимание, что уровень ММР-9 в ткани опухоли B16/F10 и LLC был ниже, чем в коже,

не затронутой злокачественным процессом, а при самостоятельном варианте роста опухолей – ниже, чем в перифокальной зоне. Это было удивительно, учитывая привычную роль металлопротеиназ.

Первоначальное представление о том, что ММР действуют как ферменты, способствующие росту опухоли и метастазированию, расчищая путь опухолевым клеткам для вторжения, в последнее десятилетие было поставлено под сомнение. Стало ясно, что ММР участвуют во многих стадиях прогрессирования и метастазирования опухоли и, следовательно, теперь считаются многогранными протеазами. Более того, недавние экспериментальные данные показывают, что некоторые члены семейства ММР ведут себя как ферменты, подавляющие опухоль, и поэтому должны рассматриваться как мишени в терапии рака. Сложность про-, противоопухолевых и метастатических функций ММР может частично объяснить, почему ингибиторы широ-

кого спектра действия не прошли клинические испытания III фазы [15].

Вместе с тем, нами показана значительная корреляция уровня MMP-9 с объемом опухолевых узлов при сочетанном варианте роста B16/F10 и LLC, что свидетельствует в пользу непосредственного участия этой металлопротеиназы в развитии опухолей. Хотя в работе [16] показано, что аденовирусная доставка MMP-9 после подкожной инъекции клеток MCF-7 голым мышам увеличивала активность MMP-9 *in vivo*, уменьшала рост опухоли, индуцировала экспрессию эндостатина и уменьшала плотность микрососудов. Сообщалось, что у мышей с дефицитом MMP-9 наблюдались пониженные уровни циркулирующего тумстатина и повышенный рост опухоли имплантированных клеток рака легкого Льюиса.

Интересные изменения уровня MMP-9 найдены в ткани перифокальных зон: при самостоятельном варианте роста опухолей уровень желатиназы значимо превышал показатели в ткани опухоли, а при сочетанном либо был ниже, как при B16, либо не имел достоверных отличий. Что касается меланомы B16, то уровень MMP-9 можно было бы связать с метастазированием: при самостоятельном варианте роста у 100% самок были метастазы в различные органы, а при сочетанном варианте только у 30% (таблица 2). Однако при LLC ни при одном из вариантов не обнаружено у животных метастазов. С другой стороны, возможно и участие воспалительных реакций в этой зоне, так как известно, что среда микроокружения опухоли сходна воспалительной реакции в заживающей ране, которая способствует ангиогенезу, обновлению внеклеточного матрикса (ЕСМ) и подвижности опухолевых клеток [12]. Последние технологические разработки заметно продвинули наше понимание MMP, как модуляторов микроокружения опухоли. Помимо своей роли в обновлении ЕСМ и миграции раковых клеток, MMP регулируют сигнальные пути, которые контролируют воспаление или ангиогенез, и могут даже работать непротеолитическим образом.

Матричная металлопротеиназа участвует в процессах, которые происходят во время заживления кожных ран, таких как воспаление, ремоделирование матрикса и эпителизации. MMP-9, которая не экспрессируется кератиноцитами в физиологических условиях, индуцируется в передней части мигрирующего эпителиального слоя и прогрессивно распространяется дистально к мигрирующему фронту при заживлении ран кожи. Мыши с дефицитом экспрессии MMP-9 обнаруживают замедленную реэпителизацию, что позволяет предположить, что MMP-9 требу-

ется для достижения надлежащего заживления ран [17]. С другой стороны, исследования показали, что во время старения кожи отмечается повышенная экспрессия MMP, включая MMP-9, и это связано с деградацией компонентов ЕСМ или накоплением эластического материала [18].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, при сочетанном развитии двух злокачественных патологий – меланомы B16/F10 и карциномы лёгкого Льюис уровень MMP-9 в опухолевых образцах имел положительную корреляцию с объемами первичных узлов. Каким бы ни был уровень MMP-9 в ткани опухоли и ее перифокальной зоне, ясно, что он непосредственно участвует в развитии опухолевой болезни.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors have no conflict of interests to declare.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Apte S. S., Parks W. C. Metalloproteinases: a parade of functions in matrix biology and an outlook for the future. *Matrix Biol.* 2015;44-46:1-6.
2. Li Y., He J., Wang F., Wang X., Yang F., Zhao C., Feng C., Li T. Role of MMP-9 in epithelial-mesenchymal transition of thyroid cancer. *World journal of surgical oncology.* 2020;18(1):181. doi:10.1186/s12957-020-01958-w.
3. Radisky E. S., Radisky D. C. Matrix metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2010;15:201-212. doi:10.1007/s10911-010-9177-x.
4. Santos M. C., de Souza A. P., Gerlach R. F., Trevilatto P. C., Scarel-Caminaga R. M., Line S. R. Inhibition of human pulpal gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by zinc oxide cements. *J Oral Rehabil.* 2010;31:660-664. doi:10.1111/j.1365-2842.2004.01297-x.
5. Reinhard S. M., Razak K., Ethell I. M. A delicate balance: role of MMP-9 in brain development and pathophysiology of neurodevelopmental disorders. *Front Cell Neurosci.* 2015;9:280. doi:10.3389/fncel.2015.00280.
6. Zariffard M. R., Anastos K., French A. L., Munyazesa E., Cohen M., Landay A. L., Spear G. T. Cleavage/alteration of interleukin-8 by matrix metalloproteinase-9 in the female lower genital tract. *PLoS One.* 2015;10:e0116911. doi:10.1371/journal.pone.0116911.
7. Hsu C. C., Huang S. F., Wang J. S., Chu W. K., Nien J. E., Chen W. S., Chow S. E. Interplay of N-cadherin and matrix metalloproteinase 9 enhances human nasopharyngeal carcinoma cell invasion. *BMC Cancer.* 2016;16:800. doi:10.1186/s12885-016-2846-4.

8. Pujada A., Walter L., Patel A., Bui T. A., Zhang Z., Zhang Y., Denning T. L., Garg P. Matrix metalloproteinase MMP-9 maintains epithelial barrier function and preserves mucosal lining in colitis associated cancer. *Oncotarget*. 2017;8:94650–94665. doi:10.18632/oncotarget.21841.

9. Pego E. R., Fernández I., Núñez M. J. Molecular basis of the effect of MMP-9 on the prostate bone metastasis: a review. *Urol Oncol*. 2018;36:S1078143918300851. doi:10.1016/j.urolonc.2018.03.009.

10. Leifler K. S., Svensson S., Abrahamsson A., Bendrik C., Robertson J., Gaudie J., Olsson A. K., Dabrosin C. Inflammation induced by MMP-9 enhances tumor regression of experimental breast cancer. *Journal of immunology*. 2013;190(8):4420–4430. doi:10.4049/jimmunol.1202610.

11. Coussens L. M., Tinkle C. L., Hanahan D., Werb Z. MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell*. 2000;103(3):481–490. doi:10.1016/s0092-8674(00)00139-2.

12. Kessenbrock K., Plaks V., Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*. 2010;141(1):52–67. doi:10.1016/j.cell.2010.03.015.

13. Кит О. И., Франциянц Е. М., Никипелова Е. А., Комарова Е. Ф., Козлова Л. С., Таварян И. С., Аверкин М. А., Черярина Н. Д. Изменения маркеров пролиферации, неоангиогенеза и системы активации плазминогена в ткани рака прямой кишки. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2015;2(114):40-45.

14. Кит О. И., Франциянц Е. М., Бандовкина В. А., Шатова Ю. С., Комарова Е. Ф., Верескунова М. И., Кучкина Л. П. Уровень половых гормонов и пролактина в ткани злокачественных опухолей молочной железы у больных разного возраста. *Фундаментальные исследования*. 2013;7-3:560-564.

15. Decock J., Thirkettle S., Wagstaff L., Edwards D. R. Matrix metalloproteinases: protective roles in cancer. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2011;15(6):1254–1265. doi:10.1111/j.1582-4934.2011.01302.x.

16. Hamano Y., Zeisberg M., Sugimoto H., Lively J. C., Maeshima Y., Yang C., Hynes R. O., Werb Z., Sudhakar A., Kalluri R. Physiological levels of tumstatin, a fragment of collagen IV alpha3 chain, are generated by MMP-9 proteolysis and suppress angiogenesis via alphaV beta3 integrin. *Cancer cell*. 2003;3(6):589–601. doi:10.1016/s1535-6108(03)00133-8.

17. Michopoulou A., Montmasson M., Garnier C., Lambert E., Dayan G., Rousselle P. A novel mechanism in wound healing: Laminin 332 drives MMP9/14 activity by recruiting syndecan-1 and CD44. *Matrix Biol*. 2020;94:1-17. doi:10.1016/j.matbio.2020.06.004.

18. Mora Huertas A. C., Schmelzer C. E., Hoehenwarter W., Heyroth F., Heinz A. Molecular-level insights into aging processes of skin elastin. *Biochimie*. 2016;128-129:163-173. doi:10.1016/j.biochi.2016.08.010.

## REFERENCES

1. Apte S. S., Parks W. C. Metalloproteinases: a parade of functions in matrix biology and an outlook for the future. *Matrix Biol*. 2015;44-46:1–6.

2. Li Y., He J., Wang F., Wang X., Yang F., Zhao C., Feng C., Li T. Role of MMP-9 in epithelial-mesenchymal transition of thyroid cancer. *World journal of surgical oncology*. 2020;18(1):181. doi:10.1186/s12957-020-01958-w.

3. Radisky E. S., Radisky D. C. Matrix metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2010;15:201–212. doi:10.1007/s10911-010-9177-x.

4. Santos M. C., de Souza A. P., Gerlach R. F., Trevilatto P. C., Scarel-Caminaga R. M., Line S. R. Inhibition of human pulpal gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by zinc oxide cements. *J Oral Rehabil*. 2010;31:660–664. doi:10.1111/j.1365-2842.2004.01297.x.

5. Reinhard S. M., Razak K., Ethell I. M. A delicate balance: role of MMP-9 in brain development and pathophysiology of neurodevelopmental disorders. *Front Cell Neurosci*. 2015;9:280. doi:10.3389/fncel.2015.00280.

6. Zariffard M. R., Anastos K., French A. L., Munyazesa E., Cohen M., Landay A. L., Spear G. T. Cleavage/alteration of interleukin-8 by matrix metalloproteinase-9 in the female lower genital tract. *PLoS One*. 2015;10:e0116911. doi:10.1371/journal.pone.0116911.

7. Hsu C. C., Huang S. F., Wang J. S., Chu W. K., Nien J. E., Chen W. S., Chow S. E. Interplay of N-cadherin and matrix metalloproteinase 9 enhances human nasopharyngeal carcinoma cell invasion. *BMC Cancer*. 2016;16:800. doi:10.1186/s12885-016-2846-4.

8. Pujada A., Walter L., Patel A., Bui T. A., Zhang Z., Zhang Y., Denning T. L., Garg P. Matrix metalloproteinase MMP9 maintains epithelial barrier function and preserves mucosal lining in colitis associated cancer. *Oncotarget*. 2017;8:94650–94665. doi:10.18632/oncotarget.21841.

9. Pego E. R., Fernández I., Núñez M. J. Molecular basis of the effect of MMP-9 on the prostate bone metastasis: a review. *Urol Oncol*. 2018;36:S1078143918300851. doi:10.1016/j.urolonc.2018.03.009.

10. Leifler K. S., Svensson S., Abrahamsson A., Bendrik C., Robertson J., Gaudie J., Olsson A. K., Dabrosin C. Inflammation induced by MMP-9 enhances tumor regression of experimental breast cancer. *Journal of immunology*. 2013;190(8):4420–4430. doi:10.4049/jimmunol.1202610.

11. Coussens L. M., Tinkle C. L., Hanahan D., Werb Z. MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell*. 2000;103(3):481–490. doi:10.1016/s0092-8674(00)00139-2.

12. Kessenbrock K., Plaks V., Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*. 2010;141(1):52–67. doi:10.1016/j.cell.2010.03.015.

13. Kit O. I., Franciyanc E. M., Nikipelova E. A., Komarova E. F., Kozlova L. S., Tavaryan I. S., Averkin M. A., Cheryarina N. D. Changes in markers of proliferation, neoangiogenesis, and the plasminogen activation system in rectal cancer tissue. *Experimental and clinical gastroenterology*. 2015;2(114):40-45. (In Russ).
14. Kit O. I., Franciyanc E. M., Bandovkina V. A., Shatova Yu. S., Komarova E. F., Vereskunova M. I., Kuchkina L. P. The level of sex hormones and prolactin in the tissue of malignant breast tumors in patients of different ages. *Basic research*. 2013;7-3:560-564. (In Russ).
15. Decock J., Thirkettle S., Wagstaff L., Edwards D. R. Matrix metalloproteinases: protective roles in cancer. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2011;15(6):1254–1265. doi:10.1111/j.1582-4934.2011.01302.x.
16. Hamano Y., Zeisberg M., Sugimoto H., Lively J. C., Maeshima Y., Yang C., Hynes R. O., Werb Z., Sudhakar A., Kalluri R. Physiological levels of tumstatin, a fragment of collagen IV alpha3 chain, are generated by MMP-9 proteolysis and suppress angiogenesis via alphaV beta3 integrin. *Cancer cell*. 2003;3(6):589–601. doi:10.1016/s1535-6108(03)00133-8.
17. Michopoulou A., Montmasson M., Garnier C., Lambert E., Dayan G., Rousselle P. A novel mechanism in wound healing: Laminin 332 drives MMP-9/14 activity by recruiting syndecan-1 and CD44. *Matrix Biol*. 2020;94:1-17. doi:10.1016/j.matbio.2020.06.004.
18. Mora Huertas A. C., Schmelzer C. E., Hoehenwarter W., Heyroth F., Heinz A. Molecular-level insights into aging processes of skin elastin. *Biochimie*. 2016;128-129:163-173. doi:10.1016/j.biochi.2016.08.010.

УДК 616.345-006: 616-008.9

DOI: 10.37279/2224-6444-2021-11-3-63-69

## МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ ПАЦИЕНТОВ С РАКОМ ТОЛСТОЙ КИШКИ

Штыгашева О. В.<sup>1</sup>, Агеева Е. С.<sup>2</sup>, Гузарь Я. Р.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Кафедра внутренних болезней, Медико-психолого-социальный институт, ФГБОУ ВО «Хакасский государственный университет им. Н. Ф. Катанова», 655000, проспект Ленина, 92, Абакан, Республика Хакасия, Россия

<sup>2</sup>Кафедра биологии медицинской, Медицинская академия имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского» 295051, бульвар Ленина, 5/7, Симферополь, Россия

<sup>3</sup>ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации», 634009, пер. Кооперативный, 5, Томск, Россия.

**Для корреспонденции:** Агеева Елизавета Сергеевна, доктор медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой биологии медицинской Медицинской академии имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского», e-mail: ageevaeliz@rambler.ru

**For correspondence:** Ageeva E.S., MD, the head of the department of Medical Biology of Medical Academy named after S.I. Georgievsky of Vernadsky CFU, e-mail: ageevaeliz@rambler.ru

### Information about authos:

**Shtygasheva O. V.**, <http://orcid.org/0000-0002-5522-1148>

**Ageeva E. S.**, <http://orcid.org/0000-0003-3770-2965>

**Guzar Ya. R.**, <http://orcid.org/0000-0003-2580-3179>

### РЕЗЮМЕ

С увеличением индекса массы тела, окружности талии, и повышением уровня глюкозы крови увеличивается риск возникновения колоректального рака. Целью работы было оценить метаболические предикторы колоректального рака у пациентов Республики Хакасия. В группу «случай» включены пациенты с колоректальным раком. Средний возраст мужчин 66,5 (62,7-71,4) лет, женщин – 62,5 (57,2-67,4) лет. В группу «контроль» вошли пациенты с метаболическим синдромом без злокачественных новообразований, аналогичные группе «случай» по полу и возрасту: средний возраст мужчин – 53,8 (47,3-57,4) лет, женщин - 61,9 (48,1-61,6) лет. В группе «случай» с колоректальным раком эксцесс массы тела фиксировался у 81,3 % пациентов до манифестации злокачественных новообразований, нормальная и избыточная масса тела чаще встречалась у мужчин, а ожирение 1 степени – у женщин. Число пациентов с ожирением и избыточной массой тела увеличивается после 60 лет, вне зависимости от пола. Кроме того среди пациентов с колоректальным раком фиксируется статистически значимое увеличение пациентов с 5-компонентным метаболическим синдромом, как среди женщин, так и среди мужчин. Стратифицируя пациентов по индексу массы тела, эксцесс массы тела установлен у всех представителей группы «контроль» с метаболическим синдромом. После 50 лет количество мужчин с ожирением 1 и 3 степеней увеличивалось, а после 60 лет - резко снижалось. Число женщин с ожирением 1 степени резко возрастало к 60 годам, и сохранялась в более позднем возрасте. Метаболический синдром среди мужчин в возрасте до 50 лет представлен в основном тремя слагаемыми, в период 50-60 лет увеличивается доля пациентов с 4 и 5 компонентами, а после 60 лет – многокомпонентность резко снижалась. Среди женщин экспансия компонентов также связана с увеличением возраста, однако после 60 лет число пациенток с метаболическим синдромом резко увеличивалось.

**Ключевые слова:** колоректальный рак, абдоминальное ожирение, эксцессивная масса тела, метаболический синдром.

### METABOLIC PROFILE OF COLOR CANCER PATIENTS

Shtygasheva O. V.<sup>1</sup>, Ageeva E. S.<sup>2</sup>, Guzar Ya. R.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Katanov Khakass State University», Abakan, Russia

<sup>2</sup>Medical Academy named after S. I. Georgievsky of Vernadsky CFU, Simferopol, Russia

<sup>3</sup>Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

### SUMMARY

With an increase in body mass index, waist circumference, and an increase in blood glucose, the risk of colorectal cancer increases. The aim of the work was to evaluate metabolic predictors of colorectal cancer in patients of the Republic of Khakassia. The case group includes patients with colorectal cancer. The average age of men is 66.5 (62.7-71.4) years, of women - 62.5 (57.2-67.4) years. The «control» group included patients with metabolic syndrome without malignant neoplasms, similar to the «case» group by sex and age: the average age of men - 53.8 (47.3-57.4) years, women - 61.9 (48, 1-61.6) years. The «control» group included patients with metabolic syndrome without malignant neoplasms, similar to the «case» group by sex and age: the average age of men - 53.8 (47.3-57.4) years, women - 61.9 (48, 1-61.6) years. In the case group with colorectal cancer, excess body weight was recorded in 81.3% of patients before the onset of malignant neoplasms, normal and overweight were more common in men, and obesity

of the 1st degree - in women. The number of obese and overweight patients increases after the age of 60, regardless of gender. In addition, among patients with colorectal cancer, there is a statistically significant increase in patients with 5-component metabolic syndrome, both among women and among men. By stratifying patients by body mass index, excess body mass was established in all representatives of the «control» group with metabolic syndrome. After 50 years, the number of men with obesity of 1 and 3 degrees increased, and after 60 years - it sharply decreased. The number of women with grade 1 obesity increased sharply by the age of 60, and remained at a later age. The metabolic syndrome among men under the age of 50 is mainly represented by three terms, in the period 50-60 years, the proportion of patients with 4 and 5 components increases, and after 60 years, the multicomponent level decreases sharply. Among women, the expansion of components is also associated with an increase in age, however, after 60 years, the number of patients with metabolic syndrome increased sharply.

**Key words:** colorectal cancer, abdominal obesity, excess body weight, metabolic syndrome.

Эксперты ВОЗ оценивают глобальную тенденцию распространенности метаболического синдрома в мире, как пандемию. Частота МС в популяции населения 30-69 лет составляет 20-40%. Дефиниция МС включает увеличение массы висцерального жира (абдоминальное ожирение), снижение чувствительности периферических тканей к инсулину и гиперинсулинемию, которые вызывают развитие нарушений углеводного, липидного, пуринового обменов и артериальной гипертензии [1]. Классический вариант МС дополняется за счет включения других компонентов: неалкогольная жировая болезнь печени, желчнокаменная болезнь. Способен ли МС повысить риск развития осложнений в большей степени в совокупности, чем каждая отдельно взятая патология, входящая в состав МС или ассоциированная с ним? [2]. Этот прогностический вопрос пока является дилеммой.

Риск инцидентов КРР повышается с увеличением индекса массы тела, увеличением окружности талии, снижением уровня ХС ЛПВП и повышением уровня глюкозы сыворотки крови натощак [3; 4]. Страдающие СД 2 типа, имеют повышенный риск развития КРР, что связывают с резистентностью к инсулину и гипергликемией [5]. Лица, имеющие МС или его отдельные компоненты также имеют более высокий риск развития аденом ободочной и прямой кишки, которые в 95% случаев предшествуют ЗНО толстой кишки [6]. Некоторые компоненты МС более тесно связаны с развитием рака ободочной кишки, чем с раком прямой кишки. Также имеются различия в ассоциации МС и его компонентов со злокачественными образованиями толстой кишки в зависимости от пола [4].

Каждый пятый инцидент ЗНО связан с ожирением, а риск КРР при ожирении увеличивается на 25-30% [7]. Прогнозируется, что к 2025 году от ожирения будут страдать 40% мужчин и 50% женщин в мире [4; 8]. Означает ли этот прогноз и симультанный рост патологии, имеющей патогенетические ассоциации с эксцессом массы тела и МС?

Целью данной работы являлось оценить метаболические предикторы КРР у пациентов Республики Хакасия.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено в популяции Республики Хакасия, как «случай-контроль». В группу «случай» включены пациенты госпитального контингента ГБУЗ Республики Хакасия «Республиканский клинический онкологический диспансер» с впервые установленным диагнозом КРР (2018 и 2019 г.г.) в соответствии с классификациями TNM и МКБ-10 (ЗНО ободочной кишки – С18; ректосигмоидного соединения – С19; прямой кишки – С20). Отбор пациентов проведен методами случайного отбора и систематического построения выборки - каждый второй (50%) от среднего ежегодного числа пациентов с КРР в Хакасии (n=96, в возрасте 30–87 лет). Средний возраст мужчин составил 66,5 (62,7-71,4) лет (n=47), а женщин – 62,5 (57,2-67,4) лет (n=49). Среди когорты пациентов с КРР проведено анкетирование для выявления метаболических предикторов в период, предшествующий манифестации заболевания. В генеральной совокупности пациентов с КРР дистальную локализацию опухоли имели 95,9% (n=92), среди них 46,9% женщин и 49,0% мужчин; проксимальная локализация опухоли - 4,1% (n=4, все женщины).

В группу «контроль» вошло 117 пациентов с МС сопоставимых по полу и возрасту с группой «случай». Средний возраст мужчин – 53,8 (47,3-57,4) лет (n=42), женщин – 61,9 (48,1-61,6) лет (n=75). МС верифицировали при наличии не менее 3-х компонентов: 1-го основного (АО) и 2-х дополнительных, согласно критериям IDF, 2005 [11]: увеличение уровня ТГ больше 1,7 ммоль/л или проведение снижающей ТГ терапии; уровень ЛПВП меньше 1,03 ммоль/л для мужчин и меньше 1,29 ммоль/л для женщин или проведение специфической терапии; гипергликемия натощак – больше 5,6 ммоль/л или ранее установленный диагноз СД 2 типа; АГ (САД >130 мм рт.ст. или ДАД >85 мм рт.ст.) или гипотензивная терапия. АО оценивали по охвату талии: у мужчин  $\geq 94$  см, у женщин  $\geq 80$  см. ИМТ вычислялся по формуле Кетле, а стратифицировался по классификации ВОЗ, 1997 г. [1]. Для верификации избыточной массы тела использовали поро-



говые величины ИМТ  $\geq 25,0$  кг/м<sup>2</sup> и ожирения  $\geq 30$  кг/м<sup>2</sup>. Фиксировали артериальное давление, содержание липидов крови: ОХС, ТГ, ХС ЛПВП, ХС ЛПНП и концентрацию глюкозы.

Пациенты, участвующие в обследовании подписывали согласие на обработку персональных данных, добровольное информированное согласие, в соответствии Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации, регламентирующей проведение научных исследований. Дизайн исследования и включение пациентов в исследование одобрен региональным Этическим комитетом.

Статистическая обработка проведена с помощью пакета прикладных программ Statistica 8.0 с применением непараметрических методов. Качественные переменные описаны абсолютными (медиана Me и квартили Q1-Q3) и относительными частотами (процентами). Для оценки статистической значимости различий между

группами пациентов использовался критерий Пирсона ( $\chi^2$ ), корреляционный анализ проводился по критерию Спирмена. Критический уровень значимости был принят при  $p < 0,05$ . Для выявления ведущих факторов риска и изучения степени их вклада в развитие КРР использовался факторный анализ.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Стратифицируя пациентов по ИМТ, установили, что в группе «случай» эксцесс массы тела фиксировался у 81,3 % пациентов до манифестации КРР, при этом нормальная и избыточная масса тела чаще встречалась у мужчин, а ожирение 1 степени – среди женщин (табл. 1).

Все представители группы «контроль» с МС имели эксцесс массы тела. Наиболее часто встречались ожирение 1 степени (40,2 %) и избыточная масса тела (30,1 %), доля женщин достоверно преобладала (табл. 1).

Таблица 1

### Стратификация индекса массы тела (ВОЗ) среди пациентов обеих групп «случай» и «контроль»

Индекс массы тела	Группа «контроль», пациенты с МС			Группа «случай», пациенты с КРР		
	Всего, % (n=117)	Мужчины, % (n=42)	Женщины, % (n=75)	Всего, % (n=96)	Мужчины, % (n=45)	Женщины, % (n=46)
Нормальная масса тела	0	0	0	30,9 (32)	19,8 (19)	11,1 (13)
Избыточная масса тела	25,2 (33)	9,4 (14)	16,2 (19)	31,6 (37)	17,9 (21)	13,7 (16)
Ожирение 1 степени	40,1 (47)	14,5 (17)	25,6 (30)	18,8 (22) <sup>1</sup>	4,3 (5) <sup>1</sup>	14,5 (17) <sup>2</sup>
Ожирение 2 степени	17,9 (21)	6,8 (8)	11,1 (13)	0	0	0
Ожирение 3 степени	13,7 (16)	2,6 (3)	11,1 (13) <sup>2</sup>	0	0	0

Примечание. n – количество человек, <sup>1</sup> - статистическая значимость ( $p < 0,05$ ) различий при сравнении показателей пациентами группы «случай» и «контроль», <sup>2</sup> – между мужчинами и женщинами (критерий  $\chi^2$ ).

Среди пациентов с МС установлены следующие закономерности распределения ЭМТ. В возрасте старше 50 лет происходит увеличение количества мужчин с ожирением 1 и 3 степеней, а после 60 лет их число резко снижается (рис. 1). Число женщин с ожирением 1 степени резко возрастает к 60 годам, и сохраняется на этом уровне в более позднем возрасте (рис. 1).

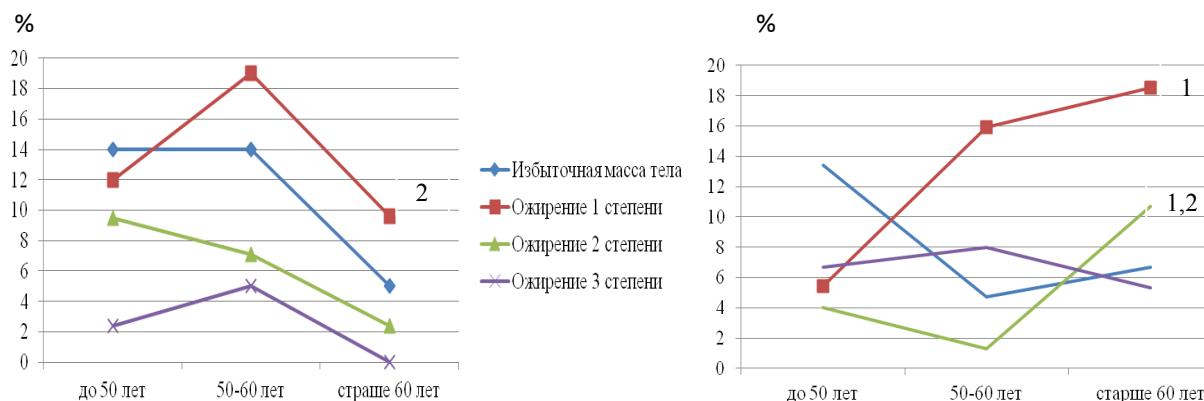
В группе «случай» среди пациентов с КРР частота ожирения и избыточной массой тела увеличивается после 60 лет, как среди мужчин, так и женщин (табл. 2).

При анализе числа компонентов метаболического синдрома у пациентов контрольной группы установлено: среди мужчин до 50 лет

он представлен в основном тремя слагаемыми, в следующий возрастной период (50-60 лет) увеличивается доля пациентов с 4 и 5 компонентами, а после 60 лет – многокомпонентность резко снижалась. Среди женщин экспансия компонентов также связана с увеличением возраста, однако после 60 лет число пациенток с МС резко увеличивалось (рис. 2).

В то же время в группе «случай» среди пациентов с КРР фиксируется статистически значимое увеличение пациентов с 5-компонентным МС, как среди женщин, так и среди мужчин (табл. 3).

У пациентов группы «случай» за несколько лет до манифестации КРР фиксировалось АО

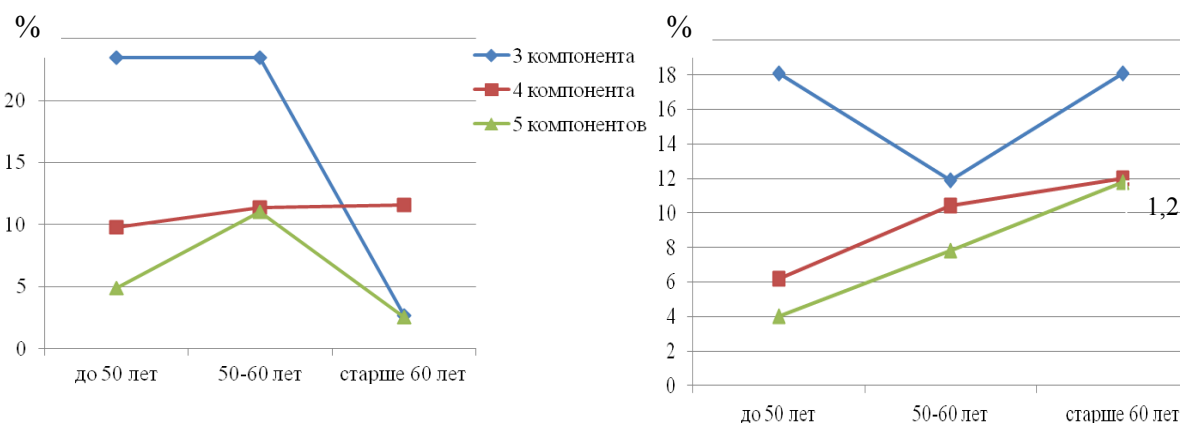


**Рис. 1.** Зависимость эксцесса массы тела от возраста и пола среди пациентов группы «контроль» с МС (А – мужчины, Б – женщины) <sup>1</sup> -  $p < 0,05$  при сравнении показателей между мужчинами и женщинами, <sup>2</sup> – между пациентами группы до 60 и 50-60 лет.

Таблица 2  
**Структура пациентов группы «случай» с КРР по степени эксцесса массы тела, полу и возрасту**

Распределение ИМТ	Все пациенты, % (n)	Мужчины, % (n)		Женщины, % (n)	
		< 60 лет	≥60 лет	<60 лет	≥60 лет
И избыточная масса тела	33	5,2 (5)	13,5 (13)	5,2 (5)	10,4 (10)
О ожирение 1 степени	40	3,1 (3)	20,8 (20) <sup>2</sup>	9,3 (9,)	8,3 (8) <sup>1</sup>
О ожирение 2 степени	23	0	5,2 (5)	4,2 (4)	14,6 (14) <sup>1,2</sup>

**Примечание.** n – количество человек, <sup>1</sup> - статистическая значимость ( $p < 0,05$ ) различий при сравнении показателей между мужчинами и женщинами, <sup>2</sup> – между пациентами группы до 60 и старше 60 лет (критерий  $\chi^2$ ).



**Рис. 2.** Структура пациентов группы «контроль» с метаболическим синдромом по числу его компонентов (А – мужчины, Б – женщины). <sup>1</sup> -  $p < 0,05$  при сравнении показателей между мужчинами и женщинами, <sup>2</sup> – пациентами с 4 и 5 компонентным МС.

Таблица 3

## Структура пациентов группы «случай» с КРР по числу компонентов МС

Параметры	3 компонента МС	4 компонента МС	5 компонентов МС
Мужчины, n (%)	2 (2,1)	3 (3,1)	7 (7,3)
Женщины, n (%)	5 (5,2)	3 (3,1)	25 (26,0) <sup>1,2</sup>

Примечание. n – количество человек, <sup>1</sup> - статистическая значимость ( $p < 0,05$ ) различий при сравнении числа пациентов с 3 и 5 компонентным МС, <sup>2</sup> – между пациентами с 4 и 5 компонентным МС (критерий  $\chi^2$ ).

(100%), сахарный диабет 2 типа документирован у 15,6 % больных. Все инциденты СД 2 ассоциированы с наследственным предрасположением (СД у родственников 1 или 2 степени родства) и ЭМТ. Среди пациентов с КРР, страдающих СД 2, женщин было в 4 раза больше, чем мужчин, все больные – старше 50 лет. В возрасте до 50 лет у мужчин и женщин этой когорты нарушений углеводного обмена не встречалось. Артериальная гипертензия установлена у 46,9 % (45) пациентов, у женщин в 3 раза чаще, чем у мужчин. У каждого второго пациента с КРР

(55,2%) встречалась атерогенная дислипидемия, у мужчин в 1,5 раза реже, чем у женщин. Верификация АГ и неблагоприятного липидного профиля также приходилась на возраст после 50 лет (таблица 4).

В группе «контроль» СД 2 установлен у 60,5% пациентов с МС, доля пациентов с нарушением углеводного обмена старше 50 лет – 81,7%. Частота СД 2, АГ (60,5%) и атерогенной дислипидемии (65,3%) были сопоставимы. Все компоненты имели большую связь с женским полом и возрастом после 50 лет (табл. 4).

Таблица 4

## Частота дополнительных компонентов метаболического синдрома у пациентов группы «контроль» (МС) и группы «случай» (КРР), ассоциированная с возрастом

Компоненты метаболического синдрома	Все пациенты, чел, % (n=117)	Мужчины чел, %		Женщины чел, %	
		<50 лет	≥50 лет	< 50 лет	≥50 лет
Пациенты с МС					
СД 2 типа	60,2 (71)	11,9 (5)	38,1 (16)	36,4 (8) <sup>2</sup>	79,2 (42) <sup>2</sup>
Атерогенная дислипидемия	60,5 (71)	8,5 (10)	13,6 (16)	8,5 (10)	29,9 (35) <sup>2</sup>
Артериальная гипертензия	65,3 (77)	21,4 (9)	45,2 (19)	54,5 (12) <sup>2</sup>	69,8 (37) <sup>2</sup>
Пациенты с КРР					
СД 2 типа	15,6 (15) <sup>1</sup>	0	3,1 (3) <sup>1</sup>	0	12,5 (12) <sup>1,2</sup>
Артериальная гипертензия	46,9 (45)	0	11,5 (11)	0	35,4 (34) <sup>2</sup>
Атерогенная дислипидемия	55,2 (53)	0	22,9 (22) <sup>1</sup>	0	32,3 (31) <sup>1</sup>

Примечание. n – количество человек, <sup>1</sup> - статистическая значимость ( $p < 0,05$ ) различий при сравнении показателей между мужчинами и женщинами, <sup>2</sup> – между мужчинами и женщинами (критерий  $\chi^2$ ).

Факторный прогностический анализ в отношении риска развития КРР выявил зависимость канцерогенного потенциала от пола (3,1;  $p=0,04$ ), а у женщин еще и от возраста (2,66;  $p < 0,01$ ). Риск КРР у женщин увеличивается при избыточной массе тела и ожирении. В то время как у мужчин риск не зависит от избыточной массы тела или ожирении ( $-0,776$   $p < 0,01$ ), что может говорить о влиянии других детерминант.

Исследование зависимости КРР от количества компонентов МС установлено: при экспансии компонентов риск развития рака увеличивается (6,16;  $p=0,014$ ).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Наше исследование подтверждает взаимосвязь КРР и МС в целом, так и его отдельных компонентов, усиливающуюся с повышением

возраста индивидуума. Тенденция увеличения возраста больных КРР на фоне МС отмечена и в других работах [1]. Экспансия компонентов МС также детерминирует канцерогенный потенциал: среди пациентов с КРР фиксируется статистически значимое увеличение пациентов с 5-компонентным МС, как среди женщин, так и среди мужчин. По данным Hoffman E.L., одновременный дебют нескольких компонентов МС по сравнению с их моно проявлением повышает риск развития сердечно-сосудистых заболеваний и ЗНО, в том числе КРР [2]. Триггерами соматических мутаций, реализующими биологическую связь между МС и канцерогенезом, являются: резистентность к инсулину – сложный феномен, развитию которого способствует ожирение, особенно АО, гиперинсулинемия, гипергликемия, инсулиноподобные факторы роста, адипоцитокينات. Есть данные об увеличении частоты прогрессирования КРР у пациентов с центральным расположением жировой ткани в 7 раз чаще, чем в группе пациентов с периферическим расположением [9; 10]. Жировая ткань секретирует адипокины (лептин, ФНО $\alpha$ , ИЛ-6, адипонектин, ингибитор активатора плазминогена-1, резистин, протеины ренин-ангиотензиново-альдостероновой системы), оказывающие регуляторное действие на основные параметры жизнедеятельности адипоцитов и других клеток организма [11]. В нашем исследовании показана зависимость риска КРР от пола. Уровень лептина в прямой зависимости с массой жировой ткани, у женщин выше, чем у мужчин. Лептин, как многофункциональный гормон с функциями цитокинов, способен активировать сигнальные пути клеточной пролиферации, инвазии, ангиогенеза и роста опухоли [12; 13]. По данным литературы, в качестве патогенетических факторов рака рассматривают также особенности рецепции и метаболизма эстрогенов, экспрессии транскрипционных и ростовых факторов, особенности функционирования важнейших протеолитических внутриклеточных систем и внеклеточных протеаз [13]. Одним из возможных путей влияния МС на опухолевые клетки может являться система инсулиноподобных факторов роста (система IGFs), включающая инсулиноподобные факторы роста (IGF-I, IGF-II), шесть связывающих инсулиноподобные факторы роста белков (IGFBPs) и тирозинкиназный рецептор инсулиноподобного фактора роста IGF-RI. По данным авторов наиболее значимые влияние на развитие КРР имели изменения сывороточного и тканевого уровней лептина и адипонектина и их рецепторов у больных с МС [14].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Различные сочетания компонентов метаболического синдрома с высокой частотой выявляются

задолго до клинического дебюта ЗНО. В когорте пациентов с КРР в популяции Республики Хакасия, самый распространенный вариант 5-компонентный МС. Метаболические предикторы с увеличением возраста обладают синергией повышения потенциала канцерогенеза. Формирование МС детерминировано генетически, но экспрессия и возраст манифестации его компонентов обусловлены стилем жизни. Мы поддерживаем выводы многих исследований относительно феномена обратимости МС. Влияя только на один из компонентов МС, можно добиться значимого для прогноза улучшения за счет компенсации изменений в других звеньях его патогенеза. Таким образом, инверсия МС, как и отдельных его слагаемых, может иметь превентивное значение для формирования ЗНО, связанных с плейотропными эффектами увеличения массы висцерального жира.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors have no conflict of interests to declare.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Дедов И. И., Мельниченко Г. А., Шестакова М. В., Трошина Е. А., Мазурина Н. В., Шестакова Е. А., Яшков Ю. И., Неймарк А. Е., Бирюкова Е. В., Бондаренко И. З., Бордан Н. С., Дзгоева Ф. Х., Ершова Е. В., Комшилова К. А., Мкртумян А. М., Петунина Н. А., Романцова Т. И., Старостина Е. Г., Стронгин Л. Г., Суплотова Л. А., Фадеев В. В. Национальные клинические рекомендации по лечению морбидного ожирения у взрослых. 3-ий пересмотр (лечение морбидного ожирения у взрослых). Ожирение и метаболизм. 2018;15(1):53-70. doi: 10.14341/OMET2018153-70
2. Hoffman E.L., Von Wald T, Hansen K. The metabolic syndrome. S. D. Med. 2015; Спец No: 24-28.
3. Häggström C., Stocks T., Rapp K. Metabolic syndrome and risk of bladder cancer: prospective cohort study in the metabolic syndrome and cancer project (Me-Can). Int. J. Cancer. 2011. 128(8):1890-8. doi:10.1002/ijc.25521.
4. Никитин Ю. П., Опенко Т. Г., Симонова Г. И. Метаболический синдром и его компоненты как возможные модифицируемые факторы риска рака (литературный обзор). Сибирский онкологический журнал. 2012;2:68-72.
5. Bjorge T., Lukanova A., Jonsson H. Metabolic Syndrome and Breast Cancer in the Me-Can (Metabolic Syndrome and Cancer) Project. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 2010;19(7):1737–1745. doi:10.1158/1055-9965.EPI-10-0230.
6. Johansen D., Stocks T., Jonsson H., Lindkvist B. Metabolic factors and the risk of pancreatic cancer: a prospective analysis of almost 580,000 men and women in the Metabolic Syndrome and Cancer Project. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2010;19(9):2307–2317. doi:10.1158/1055-9965.EPI-10-0234.

7. Demark-Wahnefried W., Platz E.A. Ligibel J.A., et al. The Role of Obesity in Cancer Survival and Recurrence. *Cancer epidemiology, biomarkers Prev.* 2012;21:1244–1259. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-12-0485.

8. Marie Ng., Fleming T., Robinson B. S. M. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet.* 2014;384(9945):766–781.

9. Prado C. M., Lieffers J. R., McCargar L. J. Prevalence and clinical implications of sarcopenic obesity in patients with solid tumours of the respiratory and gastrointestinal tracts: a population-based study. *Lancet Oncol.* 2008;9:629–635. doi:10.1016/S1470-2045(08)70153-0.

10. Rask-Andersen M., Jacobsson J. A., Moschonis G., Ek A. E. The MAP2K5-linked SNP rs2241423 is associated with BMI and obesity in two cohorts of Swedish and Greek children. *BMC medical genetics.* 2012;13(1):36. doi: 10.1186/1471-2350-13-36.

11. Джонсон Р., Эндриус П. Ген ожирения. В мире науки. 2016;08/09:112–119.

12. De Pergola G., Silvestris F. Obesity as a major risk factor for cancer. *J. Obesity.* 2013; 2013:291546. doi:10.1155/2013/291546.

13. Rothwell P. M., Wilson M., Elwin C. E. Long-term effect of aspirin on colorectal cancer incidence and mortality: 20-year follow-up of five randomised trials. *Lancet* 2010; 376(9754):1741–1750. doi:10.1016/S0140-6736(10)61543-7.

13. Штыгашева О. В., Агеева Е. С. Предикция и превенция колоректального рака, основанная на патогенетических феноменах. *Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины.* 2019;9(1):71–80.

14. Штыгашева О. В., Агеева Е. С., Гузарь Я. Р. Анамнестические предикторы колоректального рака. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология.* 2019;162(2):50–54. doi:10.31146/1682-8658-ecg-162-2-50-54.

## REFERENCES

1. Dedov I. I., Melnichenko G. A., Shestakova M. V., Troshina E. A., Mazurina N. V., Shestakova E. A., Yashkov Yu. I., Neimark A. E., Biryukova E. V., Bondarenko I. Z., Bordan N. S., Dzgoeva F. Kh., Ershova E. V., Komshilova K.A., Mkrtumyan A. M., Petunina N. A., Romantsova T. I., Starostina E. G., Strongin L. G., Suplotova L. A., Fadeev V. V. National Clinical Practice Guidelines for the Management of Morbid Obesity in Adults. 3rd revision (treatment of morbid obesity in adults). *Obesity and Metabolism.* 2018;15(1):53–70 (In Russ). doi:10.14341/OMET2018153

2. Hoffman E.L., Von Wald T, Hansen K. The metabolic syndrome. *S. D. Med.* 2015; Spec No: 24–28.

3. Häggström C., Stocks T., Rapp K. Metabolic syndrome and risk of bladder cancer: prospective cohort study in the

metabolic syndrome and cancer project (Me-Can). *Int. J. Cancer.* 2011. 128(8):1890–8. doi:10.1002/ijc.25521.

4. Nikitin Yu. P., Openko T. G., Simonova G. I. Metabolic syndrome and its components as possible modified risk factors (literature review). *Sibirskij onkologicheskij zhurnal.* 2012; 2: 68–72. (In Russ).

5. Bjorge T., Lukanova A., Jonsson H. et al. Metabolic Syndrome and Breast Cancer in the Me-Can (Metabolic Syndrome and Cancer) Project. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2010; 19 (7): 1737–1745. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-10-0230.

6. Johansen D., Stocks T., Jonsson H., Lindkvist B. Metabolic factors and the risk of pancreatic cancer: a prospective analysis of almost 580,000 men and women in the Metabolic Syndrome and Cancer Project. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010; 19 (9): 2307–2317. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-10-0234.

7. Demark-Wahnefried W., Platz E. A. Ligibel J. A. The Role of Obesity in Cancer Survival and Recurrence. *Cancer epidemiology, biomarkers Prev.* 2012; 21: 1244–1259. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-12-0485.

8. Marie Ng., Fleming T., Robinson B. S. M. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet.* 2014; 384(9945): 766–781.

9. Prado C. M., Lieffers J. R., McCargar L. J. Prevalence and clinical implications of sarcopenic obesity in patients with solid tumours of the respiratory and gastrointestinal tracts: a population-based study. *Lancet Oncol.* 2008;9:629–635. doi:10.1016/S1470-2045(08)70153-0.

10. Rask-Andersen M., Jacobsson J. A., Moschonis G., Ek A. E. The MAP2K5-linked SNP rs2241423 is associated with BMI and obesity in two cohorts of Swedish and Greek children. *BMC medical genetics.* 2012; 13(1):36. doi: 10.1186/1471-2350-13-36.

11. Dzhonson R., Ehndryus P. Gen ozhireniya. V mire nauki. 2016;08/09:112–9. (In Russ).

12. De Pergola G., Silvestris F. Obesity as a major risk factor for cancer. *J. Obesity.* 2013; 2013:291546. doi: 10.1155/2013/291546.

13. Rothwell P. M., Wilson M., Elwin C. E. Long-term effect of aspirin on colorectal cancer incidence and mortality: 20-year follow-up of five randomised trials. *Lancet* 2010;376(9754): 1741–1750. doi: 10.1016/S0140-6736(10)61543-7.

13. Shtygasheva O. V., Ageeva E. S. Prediction and prevention of the colorectal cancer based on pathogenesis phenomena. *Krymskij zhurnal eksperimental'noj i klinicheskoy mediciny.* 2019;9(1):71–80. (In Russ).

14. Shtygasheva O. V., Ageeva E. S., Guzar Ya. R. Anamnestic predictors of colorectal cancer. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология.* 2019;162(2):50–54. (In Russ). doi: 10.31146/1682-8658-ecg-162-2-50-54.

УДК: 616.995.1(09)470

DOI: 10.37279/2224-6444-2021-11-3-70-76

**К 90 ЛЕТИЮ КАФЕДРЫ МИКРОБИОЛОГИИ,  
ВИРУСОЛОГИИ И ИММУНОЛОГИИ****ПРОФЕССОРА КАФЕДРЫ: ОСНОВАТЕЛЬ И ПЕРВЫЙ ЗАВЕДУЮЩИЙ  
КАФЕДРОЙ ЩАСТНЫЙ СЕРГЕЙ МИХАЙЛОВИЧ****Хайтович А. Б.**

Кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии, Медицинская академия имени С. И. Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», 295051, бульвар Ленина, 5/7, Симферополь, Россия

**Для корреспонденции:** Хайтович Александр Борисович, доктор медицинских наук, профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии, Медицинская академия имени С. И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В. И. Вернадского», e-mail: khaytovych@rambler.ru

**For correspondence:** Aleksandr B. Khaitovich, MD, Professor of the Department of Microbiology, Virusology and Immunology, Medical Academy named after S. I. Georgievsky of Vernadsky CFU, e-mail: khaytovych@rambler.ru

**Information about author:**

**Khaitovich A. B.**, <http://orcid.org/0000-0001-9126-1182>

**РЕЗЮМЕ**

Профессор Щастный Сергей Михайлович (1875 – 1943 гг.) один из известных ученых царской России и СССР, посвятил свою профессиональную деятельность решению научных проблем эпидемиологии и микробиологии разных возбудителей инфекционных заболеваний, организации противозидемических мероприятий, проведению профилактических прививок. Талант выдающегося ученого Щастного С.М. сочетался с великолепными организаторскими способностями. При его участии и руководстве развивалась Одесская бактериологическая станция, которая была известна во всем мире и под его руководством была реорганизована в Одесский институт эпидемиологии и микробиологии им. И.И. Мечникова (ныне Украинский научно-исследовательский противочумный институт им. И.И. Мечникова). Профессором Щастным С.М. созданы несколько кафедр микробиологии в медицинских институтах - в Одесском медицинском институте (ныне университете) и Крымском медицинском институте (ныне Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского). Кафедра микробиологии была впервые создана в институте в 1931 г., вместе с 10 другими кафедрами вуза. Талантливый ученый и педагог не только создал кафедру, но и условия для подготовки студентов. Для изучения предмета профессор Щастный С.М. написал учебник «Медицинская микробиология», один из первых при Советской власти, который несколько раз переиздавался. Научные исследования профессора Щастного С.М. отражены около 50 печатных научных работ. Жизненный путь ученого был достаточно сложный. Вскоре по окончании института переехал в г. Одесса, где работал с выдающимися учеными медиками того периода; в период первой Мировой войны служил в армии, где организовывал противозидемические мероприятия; затем вернулся в г. Одессу, где возглавлял Одесскую бактериологическую станцию, которую реорганизовал в Одесский институт эпидемиологии и микробиологии им. И.И. Мечникова; затем с 1928 г. работал в Крыму в Крымском институте эпидемиологии и микробиологии (г. Севастополь) и Крымском медицинском институте (г. Симферополь); в 1938 г. был осужден, а затем направлен в Казахстан, где продолжал реализовывать свой научный и организаторский потенциал в практической медицине до последних дней своей жизни.

**Ключевые слова:** биография, кафедра, микробиология, институт, медицинский, научно-исследовательский, основатель

**PROFESSOR OF DEPARTMENT: FOUNDER AND FIRST HEAD OF  
DEPARTMENT SHCHASTNY SERGEY MIKHAILOVICH****Khaitovich A. B.**

Medical Academy named after S. I. Georgievsky of Vernadsky CFU, Simferopol, Russia

**SUMMARY**

Professor Shchastny Sergei Mikhailovich (1875 - 1943), one of the famous scientists of tsarist Russia and the USSR, devoted his professional activities to solving scientific problems of epidemiology and microbiology of various infectious agents, organizing anti-epidemic measures, and carrying out preventive vaccinations. The talent of the outstanding scientist Shchastny S.M. combined with excellent organizational skills. With his participation and leadership, the Odessa bacteriological station was developed, which was known all over the world and under his leadership was reorganized into the Odessa Institute of Epidemiology and Microbiology named after I. I. Mechnikov (now the I. I. Mechnikov Ukrainian Research Anti-Plague Institute). Professor Shchastny S.M. several departments of microbiology were created in medical institutes - at the Odessa Medical Institute (now the University) and the Crimean Medical Institute (now the Vernadsky Crimean Federal University). The Department of Microbiology was first created at the institute in 1931, together with 10 other departments of the university. A talented scientist and teacher not only created the department, but also conditions for the training of students. To study the subject, Professor Shchastny S.M. wrote

the textbook «Medical Microbiology», one of the first under Soviet rule, which was reprinted several times. Scientific research of Professor S.M. Shchastny reflected about 50 printed scientific works. The life of the scientist was quite difficult. Soon after graduating from the institute he moved to Odessa, where he worked with prominent medical scientists of that period; during the First World War, he served in the army, where he organized anti-epidemic measures; then he returned to Odessa, where he headed the Odessa bacteriological station, which he reorganized into the Odessa Institute of Epidemiology and Microbiology. I.I. Mechnikov; then from 1928 he worked in Crimea at the Crimean Institute of Epidemiology and Microbiology (Sevastopol) and the Crimean Medical Institute (Simferopol); in 1938 he was not deservedly convicted, and then sent to Kazakhstan, where he realized his scientific and organizational potential in practical medicine until the last days of his life.

**Keywords: biography, department, microbiology, institute, medical, research, founder**

Род династии медиков Щастных, вероятнее всего происходит из деревни Щастновка, находившейся около г. Киева, и основанной, по видимому, в годы царствования Екатерины II выходцами из Чехии.

Сергей Михайлович Щастный родился в Санкт-Петербурге в 1875 г. в семье чиновника, происходившего из украинских казаков Черниговской губернии. Большое влияние на профессию и отношение к ней оказала семья и близкие родственники, в том числе дядя, который был военным врачом и участвовал в обороне Крыма.

Щастный С.М. окончил в 1899 г. медицинский факультет Киевского университета святого Владимира, где еще студентом 3 курса выполнил важную работу о влиянии голодания на организм человека [1]. После окончания университета Щастный С.М. был помощником прозектора на кафедре физиологии. Его руководитель, известный патолог профессор Подвысоцкий В. В. в 1900 г. переехал в Одессу на медицинский факультет Новороссийского университета и пригласил Щастного С.М., который переехал в 1901 г. и являлся ближайшим учеником и сотрудником профессора Подвысоцкого В.В.

В период с 1901 по 1914 гг. Щастный С.М. преподавал на кафедре общей патологии и бактериологии медицинского факультета Новороссийского университета (г. Одесса) и продолжал научно-исследовательскую работу [2]. На кафедре общей патологии и бактериологии Щастным С. М. были организованы практические занятия по микробиологии, привлекавшие внимание не только студентов-медиков, но и студентов других факультетов университета [3; 4].

В начале 20-го века в г. Одесса, образовался крупнейший в России научный центр по микробиологии и эпидемиологии, формирование которого было связано с деятельностью выдающихся российских ученых в этой области профессоров Ценковского Л.С., Мечникова И.И., Гамалея Н.Ф., Заболотного Д.В. [5]. Общение и сотрудничество с выдающимися учеными и личностями оказало огромное влияние на последующую научную и медицинскую деятельность Щастного С.М., который смог унаследовать от своих учителей: непримиримость к лженаучным теч-

ниям, строгость в постановках экспериментов и объективность в оценке полученных результатов. Эти качества позволили Щастному С.М. сформироваться как ученому, но эти качества и до настоящего времени являются необходимыми для формирования мировоззрения врача, ученого, характеризуют его профессионализм, принципиальность и объективность полученных научных результатов при проводимых исследованиях.

В 1904 г. Щастный С.М. выдержал экзамен на докторскую степень, и ему было присвоено звание доктор медицины.

В эти же годы, сформировалась и проявилась гражданская позиция преподавателя Щастного С.М., который не мирился с полицейским режимом, существовавшим в Новороссийском университете в те годы; объявлял про лекции реакционных профессоров университета; в 1905 г. он был одним из организаторов прогрессивной общественной организации «Союз младших преподавателей», который совместно с «Коалиционным студенческим бюро» проводили сходки, митинги; позднее был учредителем и секретарем демократической организации университета - «Медицинского общества».

Полученные знания по микробиологии и эпидемиологии, а также результаты экспериментов в скором времени пришлось применить на практике, так как в 1910 г. в г. Одесса вспыхнула завозная эпидемия чумы. Одновременно Щастный С.М. работал помощником заведующего Одесской бактериологической станцией и незамедлительно включился в борьбу с эпидемией. Именно его лабораторными исследованиями (за период с августа 1910 г. по декабрь 1911 г. он исследовал 95057 тысяч крыс) была установлено, что причиной распространения явились крысы, отловленные на судах и обитающие в городе. Самоотверженность проявлял Щастный С. М. при взятии материала для бактериологического исследования от больных и во время вскрытия умерших от чумы. Разработанные им серологические методы диагностики чумы, а так же его экологические исследования получили всемирное признание и способствовали ликвидации чумы в г. Одессе. В результате исследований

Щастного С. М. удалось разрешить спорный вопрос о причине эпидемии чумы в г. Одессе и установить ее завозной характер через морской порт [6; 7].

Все работы, посвященные вопросам эпидемиологии, диагностики и микробиологии чумы и до настоящего времени остаются ценными и их продолжают цитировать отечественные и зарубежные авторы.

Ученому-врачу Щастному С. М. принадлежит идея организации профилактических прививок против инфекционных заболеваний [8], он добился больших успехов в снижении заболеваемости и ликвидации некоторых из них [9], что было одобрено на Всероссийском совещании «Зелинского союза» по этому вопросу в 1915 г.

В годы первой мировой войны Щастный С. М. покинул г. Одессу и служил в армии, возглавлял в Галиции санитарно-гигиенический отряд 8-го армейского корпуса, был помощником главного санитарного инспектора армии. Неоднократно в действующих войсках боролся с эпидемиями брюшного тифа и холеры. Непосредственно бывая в очагах инфекции, Щастный С. М. заразился и заболел холерой, но боевые товарищи выходили и вылечили его. Летом 1916 г. в армии появились заболевания сыпным и возвратным тифом. Щастный С. М. приложил максимум усилий для того, чтобы обеспечить все воинские части банями и приспособлениями для дезинфекции одежды, что привело не к эпидемической, а спорадической заболеваемости в отличие от других армейских соединений.

Щастный С. М. был бескорыстным другом и товарищем. Великий офтальмолог современной медицины профессор Филатов В. П., с благодарностью вспоминал о помощи оказанной Щастным С. М. над докторской диссертацией. Под его опекой начинал свою научную деятельность и другой выдающийся ученый-врач академик Богомолец А. А., который вспоминал о том, что первые шаги в лаборатории общей патологии Новороссийского университета в г. Одесса были сделаны при участии и неизменной поддержке Щастного С. М.

Демобилизовавшись в 1918 г., Щастный С. М. возвращается на кафедру общей патологии и микробиологии медицинского факультета университета. Командированный в г. Киев на совещание по реформе Высшей школы, профессор Щастный С. М. прилагал много усилий для реорганизации медицинского факультета университета в самостоятельный медицинский институт.

В 1919 г. Щастному С. М. было присвоено звание профессора, в том же году он избирает-

ся по конкурсу профессором кафедры бактериологии высших женских медицинских курсов, реорганизованных впоследствии в Одесский государственный химико-фармацевтический институт, где проработал до 1928 г.

Беззаветно преданный своему врачебному долгу, профессор Щастный С. М. включается в борьбу с паразитарными тифами, брюшным тифом и холерой, эпидемии которых приняли огромные размеры на юге Украины в результате гражданской войны и иностранной интервенции. Для этого он активно работал в Чрезвычайной Комиссии по борьбе с сыпным тифом и холерой «Чрезсыптитиф». Для срочной подготовки врачей эпидемиологов Щастный С. М. в 1919 году переиздает «Краткий курс микробиологии инфекционных болезней» для врачей и сотрудников, одно из первых руководств этого направления, изданных при Советской власти.

Время и ситуация складывающаяся в южном регионе Украины требовало расширения деятельности и повышения активности Одесской бактериологической станции в борьбе с эпидемиями. В 1919 г. профессор Щастный С. М. назначается директором и научным руководителем этой станции. Под руководством Щастного С. М. в 1920 г. Одесская бактериологическая станция реорганизуется в Одесский институт эпидемиологии и микробиологии им. И. И. Мечникова (по распоряжению Премьер-министра Украины в 1999 г. вышеуказанный институт объединился с Украинской государственной противочумной станцией Минздрава Украины и образовался Украинский научно-исследовательский противочумный институт им. И. И. Мечникова). Одесский институт эпидемиологии и микробиологии им. И. И. Мечникова на 80 лет стал центром противоэпидемических мероприятий в южных регионах Украины и головным учреждением по гриппу в Украине (рис. 1). При реорганизации структуры института организуется дополнительно 3 подразделения, где отдел чумы возглавил сам профессор. Научные интересы у Сергея Михайловича очень широкие, он проводит научные исследования по малярии, бешенству, вакцине БСЖ и другим проблемам.

В 1921 г. профессор Щастный С. М. организовывает в Одесском медицинском институте кафедру микробиологии, где занимается преподавательской деятельностью.

Однако, основное внимание он сосредотачивает на работе в институте, который возглавлял 9 лет. За эти годы значительно увеличился объем производства вакцин и сывороток, организовано три новых отдела, децентрализованы пастеровские прививки, вдвое увеличился штат, издано в институте свыше 100 научных работ. Будучи



автором целого ряда капитальных исследований (в том числе «Медицинская микробиология», учебник по микробиологии инфекционных заболеваний и др.), он на посту директора института продолжает заниматься наукой. Из работ того периода наиболее важными являются «Современное состояние вопроса о противохолерных прививках», «Противохолерные прививки, сыпно-возвратно-тифозная инфекция и голод», «О прививках против бешенства» (рис.1).

В 1928 г. Наркомздрав СССР поручает в качестве директора профессору Щастному С. М. реорганизацию и укрепление Крымского (Севастопольского) института эпидемиологии и микробиологии, который в 1931 г. переводиться в г. Симферополь. В этот период он избирается членом президиума Севастопольского горсовета, членом президиума Научной ассоциации врачей.

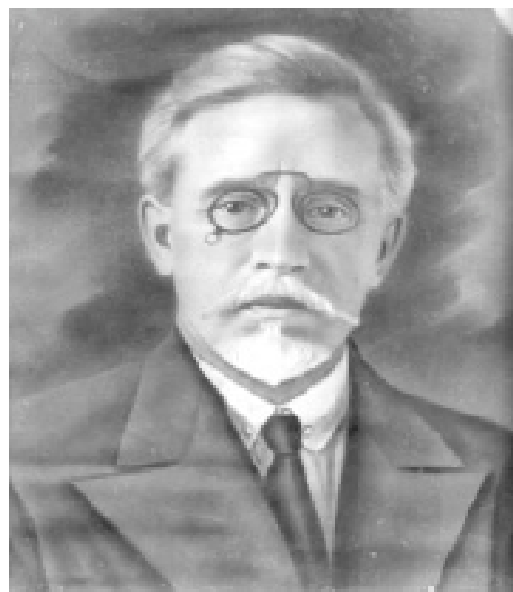
В 1931 г. был повторно открыт Крымский медицинский институт, которому переданы было здание технического рабочего факультета и в начале года произведен первый набор студентов в 100 человек, который начал занятия с 1 апреля. В составе института был один лечебный факультет и организовано 10 первых кафедр: анатомии человека, биологии, гистологии, эмбриологии, патологической анатомии, общей химии, физики, фармакологии, микробиологии. Кафедру микробиологии Крымского медицинского института создал и возглавил профессор Щастный С. М., которой руководил ею с 1931 по 1938 г. (рис.2).

Изначально было решено назвать вуз «Крымский медицинский институт имени Перекопской Победы», но в процессе организации название изменили на «Крымский государственный медицинский институт имени Фрунзе» – в честь командующего Южным фронтом. 25 сентября 1931 г., вузу присвоили имя И.В. Сталина. В честь вождя институт назывался в течение 25 лет — до апреля 1956 г. [10].

Профессор Щастный С.М. является основателем кафедры микробиологии (ныне кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии), и первым заведующим кафедрой. Он впервые в Крымском медицинском институте (на медицинском факультете Таврического университета кафедры микробиологии не было кафедры микробиологии) организовал преподавание курса микробиологии. Известно, что профессор очень скоро стал одним из любимых наставников у студентов (рис.3). На кафедре он занимался не только организацией процесса обучения студентов и преподаванием микробиологии, но активно продолжает исследования по проблеме вакцинации против туберкулеза вакциной БЦЖ;



**Рис. 1. Празднование 40-летия Одесского бактериологического института им. Мечникова. 1926 год. В первом ряду сидят (слева направо): академик Л. А. Тарасевич, академик Д. К. Заболотный, профессора: В. К. Стефанский, П. Н. Диатроптов, Н. Ф. Гамалея, Я. Ю. Бардах, директор института С. М. Щастный, профессора: М. П. Нецадименко, Н. Н. Клодницкий.**



**Рис. 2. ЩАСТНЫЙ Сергей Михайлович (1875-1943) - советский микробиолог, эпидемиолог, организатор здравоохранения, доктор медицины (1904), профессор (1919).**

эпидемиологии, эпизоотологии и диагностике чумы (течение хронической чумы у крыс); изучению этиологии и патогенеза пищевых отравлений и другими проблемами [11; 12].

В 1938 г. профессор Щастный С.М. был незаконно арестован, в течение 3 лет провел в тюрьме, а затем отправлен в ссылку в Казахстан, Павлоградскую область, т.е. последние годы выдающегося ученого и человека прошли вдалеке от Украины, хотя семья жила в г. Одессе (рис.4).



**Рис.3. Фрагмент фотографии профессорско-преподавательского состава 1 выпуска (февраль 1936 года) и 2 выпуска (июль 1936 года) Крымского медицинского института имени И.В. Сталина.**

Первый (верхний) ряд слева направо: заведующий кафедрой акушерства и гинекологии профессор Б.С. Тарло; заведующий кафедрой хирургии профессор А.Н. Круглов; профессор кафедрой госпитальной терапии Э.А. Мелик-Гюльназарьян; секретарь комитета ВЛКСМ Н.А. Флат; заведующий кафедрой нормальной физиологии, заведующий по учебной части, профессор Т. Г. Гуреев; директор института В. А. Таргулов; Нарком здравоохранения Крымской АССР Р. Бекирова; Секретарь парткома А.З. Хаскин; Председатель профкома В. Лемиш; Председатель месткома доктор М. Манулкин; заведующий кафедрой гигиены профессор И.Н. Окулов;

заведующая кафедрой внутренней медицины профессор Р. Е. Гинзбург; заведующий кафедрой психиатрии и наркологии профессор Н.И. Балабан.

Второй (нижний) ряд слева направо: заведующий кафедрой неорганической химии профессор П.Т. Данильченко; заведующий кафедрой физики доцент И.И. Попов; заведующий кафедрой отоларингологии профессор С.В. Михайловский; заведующий кафедрой глазных болезней профессор А.А. Бельский; заведующий кафедрой кожных и венерических болезней профессор М.И. Пер; заведующий кафедрой фармакологии профессор С.Д. Соколов; заведующий кафедрой микробиологии профессор С.М. Щастный; заведующий кафедрой патологической физиологии профессор Н.В. Колпиков; заведующий кафедрой топографической анатомии и оперативной хирургии профессор В. М. Тоцкий; профессор кафедры судебной медицины Я.Е. Браул; профессор кафедры детских болезней Г.Г. Стукс; профессор М.А. Петрова; заведующий кафедрой анатомии человека профессор В. В. Бобин; заведующий кафедрой общей хирургии профессор К.П. Гресс-де-Кальве; профессор В.А. Батенков; М.А. Эмин.

Свою третью войну он встретил в Казахстане, в селе Иртышск, где не прекращал научной деятельности. Несмотря на пенсионный возраст и ослабшее здоровье, он добровольно принял участие в противоэпидемической работе, трудился районным эпидемиологом, заведующим районной санитарно-эпидемиологической станции.

Зимой 1941-1943 г. в Казахстане свирепствовал сыпной тиф. В тяжелых условиях военного времени, без транспорта, в зимнюю непогоду, в населенные пункты района, причем отдаленные, выезжал с коллегами на быках или шли пешком. Открывали изолятор, делали подворные обходы, и профессор Щастный С.М. полностью отдавал себя службе, был очень внимателен к больным, требовал от сотрудников дисциплины и со свойственной ему энергией добивался осуществления мероприятий по борьбе с сыпным тифом и другими инфекциями. Несмотря на отсутствие термостата и пробирок, сумел наладить серологическую диагностику тифов, используя в качестве пробирок тару из-под таблеток. Что же касается отсутствия термостата, он на ночь клал штатив с пробирками под свою подушку, а то и за пазуху, как результат - заражение сыпным



**Рис 4. Доходный дом Ю. Ломейра. Построен в 1911 году по проекту архитектора В.И. Прохаска. Памятник истории и архитектуры, в котором проживал Щастный С.М. с семьей в 20-е годы (в пятикомнатной квартире).**

тифом, от которого он умер 13 марта 1943 г. в возрасте 67 лет в с. Грабово (Казахстан) и похоронен в п. Иртышске (совхоз «Суворовский»).

Жена профессора Щастного С. М., Варвара Петровна, вспоминала: «Сразу после октябрь-

ского переворота Пастеровский институт готов был предоставить возглавляемой Сергеем Михайловичем лаборатории в Одесской бактериологической станции вагон для переезда во Францию, но профессор Щастный С.М. только сказал: «Я люблю Украину, украинские песни, Шевченко! Как мне без них?». Всю свою сознательную жизнь профессор Щастный С. М. провел в условиях жесткой опасности, но всегда при этом думал о здоровье и счастье своего народа. Для современного и молодого поколения врачей его многогранная деятельность является прекрасным примером самоотверженного выполнения врачебного долга перед Родиной.

Династия Щастного С.М. продолжается, дети: сын Дмитрий и дочь Надежда тоже посвятили себя микробиологии и эпидемиологии. Внук Григорий — доцент кафедры организации здравоохранения Львовского мединститута. Правнук Артем также трудится в медицине.

Щастный С. М. — автор около 50 научных работ, посвященных эпидемиологии и диагностике чумы, хронической чуме у крыс, изучению этиологии и патогенеза пищевых отравлений. В ряде его работ представлены результаты оценки эффективности вакцины БЦЖ, изучения анафилаксии (совместно с Тарасевичем И. А.). Щастный С. М. внес значительный вклад в разработку мероприятий по борьбе с инфекционными болезнями (чумой, холерой, сыпным и возвратным тифами и др.). Краткий курс микробиологии инфекционных болезней Щастного С. М. выдержал два издания и способствовал подготовке кадров микробиологов, эпидемиологов и инфекционистов в стране.

Щастный С. М. был членом Ученого совета Народного комиссариата здравоохранения УССР, Всеукраинского санитарного совета, членом ряда отечественных научных медицинских обществ.

Об ученом такого высокого уровня, каким был профессор Щастный С.М. написано достаточно много работ в научной и библиографической литературе [13 - 19].

Заключение.

Щастный Сергей Михайлович — профессор, доктор медицины, известный ученый в области эпидемиологии и микробиологии. Создал кафедру микробиологии и был первым заведующим кафедрой микробиологии Крымского медицинского института им. И.В. Сталина (ныне кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии Медицинской академии имени С. И. Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского»). Жизненный путь Щастного С.М. это пример беззаветной любви к науке, Родине, сотрудникам,

студентам и многих людей, которые его окружали. Его беззаветное служение эпидемиологии и микробиологии заслуживает не только высокой профессиональной оценки, но и показывает, насколько он труден и тернист. Важно и то, что его слова «Бойцы идут под пули, а мы, эпидемиологи, подвергаемся опасности в борьбе с инфекциями... Если умру, то как боец на боевом посту» были пророческими и реализованы собственной жизнью. Для нас, последующих поколений преподавателей кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии, важно помнить и продолжать традиции заложенные профессором Щастным Сергеем Михайловичем — основателем кафедры микробиологии в Крымском медицинском институте.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Щастный С. М. Изменения внутренних органов человека, умершего от голодания, продолжавшегося дней. СПб.: К. Л. Риккер; 1898.
2. Щастный С.М., Тарасевич Л.А. О причинах быстрой смерти иммунизированных чужою кровью животных под влиянием последующего внутривенного впрыскивания такой же крови. СПб.: тип. Я. Трей; 1902.
3. Щастный С. М. Бактериология при инфекционных болезнях; 1912.
4. Щастный С.М. Краткий курс микробиологии инфекционных болезней. Одесса, 1912. Экономия. 4 л.
5. Щастный С. М. Памяти профессора Даниила Кирилловича Заболотного [1866–1929]. Саратов; 1930.
6. Щастный С.М. К вопросу о так называемой «хронической» чуме крыс в Одессе / Рус. врач. 1912;(10):341.
7. Щастный С.М. Отчет по исследованию крыс на Одесской бактериологической станции с сентября 1910 года по декабрь 1911 года (за 15 мес.) / В книге: Чума в Одессе в 1910 г., под ред. Л. Н. Малиновского и др., Спб.; 1912.
8. Щастный С. М. О предохранительных прививках против тифа и холеры. Омск; 1924.
9. Щастный С.М. Гонококк = *Gonococcus*. Киев: Петр Барский в Киеве; 1912.
10. Маленькие истории. Частное собрание, фактор и артофактор. Врачи народа <https://little-histories.org>. 2014.07.05 враги народа.
11. Щастный С. М., Кремер Б.И. Москит и москитная лихорадка в Крыму. Севастополь: Красный Черноморец; 1930.
12. Щастный С. М. Оспа и борьба с ней. Симферополь: Крымполиграфтрест, 1932. 14 с.
13. Клодницкая С. Н., С. М. Щастный - выдающийся микробиолог и организатор советского здравоохранения. Врач, дело. 1960;(6):651.
14. Занчевска Т. А., Щастный Д. С. Сергей Михайлович Щастный. К 100- летию со дня рождения / Жур-

нал микробиология, эпидемиология и иммунология. 1975;(10):142.

15. Биология. Биографический справочник. Киев.: Наук. Думка; 1984.

16. Золотарев А. Е., Илькин И. И., Луки Л. Г. Биографический словарь профессоров Одесского медицинского института им. Н. И Пирогова (1900-1990 г.г.). Одесса. Маяк; 1991.

17. Попов Р. Мир ученых в Крыму. Исторический очерк. Симферополь. Доля; 2007.

18. Антипов Н. Г., Купченко К. В. Профессор Сергей Михайлович Щастный. Врач, ученый, педагог. Матеріали науково-практичної присвяченні 160-річчю з дня народження видатного українського патолога, ендокринолога, імунолога, мікробіолога професора Володимира Валеріановича Підвисоцького та Дню Фармацевта. Одеса. 15 вересня 2015 року. Одеса. Міжнародний гуманітарний університет. 2015:24-29.

19. Непомнящий А.А., Кравчук А.С., Ломакин Д.А., Грушецкая В.А., Ислямов Э.М. под редакцией / Профессора Крымского федерального университета им. В.И. Вернадского: в 3-х томах. Щастный Сергей Михайлович. Белгород: Константа. 2018;3: 337-338.

## REFERENCES

1. Shchastny SM Changes in the internal organs of a person who died from starvation, which lasted for days. SPb.: K.L. Rikker; 1898. (In Russ.).

2. Shchastny S.M., Tarasevich L.A. On the causes of the rapid death of animals immunized with foreign blood under the influence of the subsequent intravenous injection of the same blood. SPb.: type. J. Trey; 1902. (In Russ.).

3. Shchastny SM Bacteriology in infectious diseases; 1912. (In Russ.).

4. Shchastny S.M. A short course in the microbiology of infectious diseases. Odessa; 1912. Economy. 4 l. (In Russ.).

5. Shchastny SM In memory of Professor Daniil Kirillovich Zabolotny [1866–1929]. Saratov; 1930. (In Russ.).

6. Shchastny S.M. On the issue of the so-called «chronic» rat plague in Odessa / Rus. Doctor. 1912;(10):341. (In Russ.).

7. Shchastny S.M. Report on the study of rats at the Odessa bacteriological station from September 1910 to

December 1911 (for 15 months) / In the book: Plague in Odessa in 1910, ed. L.N. Malinovsky and others, St. Petersburg; 1912. (In Russ.).

8. Shchastny SM About preventive vaccinations against typhus and cholera. Omsk, [1924]. 12 p. (In Russ.).

9. Shchastny S.M. Gonococcus = Gonococcus. Kiev: Peter Barsky in Kiev; 1912. (In Russ.).

10. Small stories. Private collection, factor and art factor. Doctors of the people <https://little-histories.org>. 2014.07.05. enemies of the people. (In Russ.).

11. Shchastny S. M., Kremer B. I. Mosquito and mosquito fever in Crimea. Sevastopol: Red Chernomoretz; 1930. (In Russ.).

12. Shchastny SM Smallpox and the fight against it. Simferopol: Krympoligrafrest; 1932. (In Russ.).

13. Klodnitskaya SN, SM Shchastny - an outstanding microbiologist and organizer of Soviet health care. Doctor, business. 1960;(6):651. (In Russ.).

14. Zanchevska T. A., Shchastny D. S. Sergei Mikhailovich Shchastny. On the centenary of birth. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunology. 1975;(10):142. (In Russ.).

15. Biology. Biographical reference. Kiev: Nauk. Dumka; 1984. (In Russ.).

16. Zolotarev AE, Ilkin II, Luke LG Biographical Dictionary of Professors of the Odessa Medical Institute. N. And Pirogova (1900-1990). Odessa. Lighthouse; 1991. (In Russ.).

17. Popov R. The world of scientists in the Crimea. Historical sketch. Simferopol. Share; 2007. (In Russ.).

18. Antipov N. G., Kupchenko K. V. Professor Sergei Mikhailovich Shchastny. Doctor, scientist, teacher. Materials of scientific and practical dedication of the 160th anniversary of the day of the people of the prominent Ukrainian pathologist, endocrinologist, immunologist, microbiologist Professor Volodymyr Valerianovich Pidvisotsky and the Day of the Pharmacist. Odessa. 15 spring 2015 rock. Odessa. International Humanitarian University. 2015:24-29. (In Russ.).

19. Nepomnyashchy A.A., Kravchuk A.S., Lomakin D.A., Grushetskaya V.A., Islyamov E.M. under the editorship / Professor of the Crimean Federal University. IN AND. Vernadsky: in 3 volumes. Shchastny Sergei Mikhailovich. Belgorod: Constant. 2018;3: 337-338. (In Russ.).

УДК 616.08:616.98:577

DOI: 10.37279/2224-6444-2021-11-3-77-84

## ВЛИЯНИЕ ИММУНОТРОПНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ПРОТЕКАНИЕ ЦИТОКИНОВОГО ШТОРМА ПРИ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ (НА ПРИМЕРЕ КЛИНИЧЕСКОГО СЛУЧАЯ)

Землянухина О. А.<sup>1</sup>, Остроушко И. П.<sup>2</sup>, Суворова И. М.<sup>2</sup>, Кривошеева Е. В.<sup>2</sup>, Калаев В. Н.<sup>1</sup>,

Ларина А. В.<sup>1</sup>, Семенова Е. Ф.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет» (ФГБОУ ВО «ВГУ»), 394018, площадь Университетская 1, Воронеж, Россия

<sup>2</sup>БУЗ ВО «Воронежская областная клиническая больница №1», 394066, Московский проспект 151, Воронеж, Россия

<sup>3</sup>Медицинская академия имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского», 295051, бульвар Ленина 5/7, Симферополь, Россия

**Для корреспонденции:** Землянухина Ольга Александровна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, ФГБОУ ВО «ВГУ», e-mail: oz54@mail.ru

**For correspondence:** Olga A. Zemlyanukhina, Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher, VSU, e-mail: oz54@mail.ru

### Information about authors:

**Zemlyanukhina O. A.**, <https://orcid.org/0000-0003-4221-4413>

**Ostroushko I. P.**, <https://orcid.org/0000-0001-5661-3947>

**Suvorova I. M.**, <https://orcid.org/0000-0002-9856-866X>

**Krivosheeva E. V.**, <https://orcid.org/0000-0003-1122-1178>

**Kalaev V. N.**, <https://orcid.org/0000-0002-4247-4509>

**Larina A. V.**, <https://orcid.org/0000-0001-5389-9580>

**Semenova E. F.**, <http://orcid.org/0000-0002-7987-6886>

### РЕЗЮМЕ

На примере одного клинического случая показано влияние 3 иммунотропных препаратов: гидроксихлорохина, тоцилизумаба, артлегии на протекание цитокинового шторма при коронавирусной инфекции. Коронавирус относится к системной инфекции, поражая не только легкие и дыхательные пути, но и другие органы и системы: сердечно-сосудистую, иммунную и др. Тактика лечения зависела от кормобидного статуса пациента. В данном случае в анамнезе пожилой пациентки (66 лет) имелись бронхиальная астма и онкология. Пациентка была переведена в стационарные условия после 7 дней гипертермии (более 38°C). Наблюдались лимфопения, повышенная СОЭ (43 мм/час). Биохимические показатели также имели отклонения: уровень ЛДГ был равен 606 ед/л (при верхней границе нормы 450 ед/л), уровень ИЛ-6 был повышен незначительно – 16.0 пг/мл (норма 0-10 пг/мл). На этой стадии заболевания применяли новоклав с целью предотвращения бактериальной инфекции, дексаметазон, цибор – антикоагулянт прямого действия, гидроксихлорохин. Через неделю состояние пациентки значительно ухудшилось. Наблюдалась одышка, гипертермия держалась на уровне 38.5 °С, сатурация снизилась до 77 %, содержание ИЛ-6 превысило 300 пг/мл, прокальцитонина возросло до 0.5 мкг/л, С-реактивного белка до 67.5 мг/л, ферритина до 579 мг/мл, что соответствовало проявлению симптомов «цитокинового шторма». Однократное введение иммунотропного препарата тоцилизумаба на протяжении следующих трех суток не привело к снижению показателей. Пациентка была переведена на неинвазивную вентиляцию легких с одновременным введением другого, блокирующего непосредственно ИЛ-6 препарата, – артлегии в дозе 64 мг. В течение суток концентрация С-реактивного белка, уровень АСАТ и интерлейкина-6 снизились до нормы. Через неделю состояние пациентки стало удовлетворительным, и она была выписана из стационара с поражением легких КТ-3. Можно говорить, что использование клинических биомаркеров воспаления (С-реактивного белка и ИЛ-6) позволяет выработать индивидуальный подход в лечении тяжелых случаев коронавирусной инфекции.

**Ключевые слова:** коронавирус, клинические проявления, цитокиновый шторм, лечение, иммуносупрессивные препараты, гидроксихлорохин, тоцилизумаб.

### THE INFLUENCE OF IMMUNOTROPIC DRUGS ON THE CYTOKINE STORM IN CORONAVIRUS INFECTION (ON THE EXAMPLE OF A CLINICAL CASE)

Zemlyanukhina O. A.<sup>1</sup>, Ostroushko I. P.<sup>2</sup>, Suvorova I. M.<sup>2</sup>, Krivosheeva E. V.<sup>2</sup>, Kalaev V. N.<sup>1</sup>,  
Larina A. V.<sup>1</sup>, Semenova E. F.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Voronezh State University, Voronezh, Russia

<sup>2</sup>Voronezh Regional Clinical Hospital No. 1, Voronezh, Russia

<sup>3</sup>Medical Academy named after S. I. Georgievsky of Vernadsky CFU, Simferopol, Russia

### SUMMARY

On the example of one clinical case, the effects of three immunotropic drugs: hydroxychloroquine, tocilizumab, and

arthralgia on the course of cytokine storm in coronavirus infection were shown. Coronavirus refers to a systemic infection, affecting not only the lungs and respiratory tract, but also other organs and systems: cardiovascular, immune, etc. The tactics of treatment depended on the feeding status of the patient. In this case, an elderly female patient (66 years old) had bronchial asthma and oncology in the anamnesis. The patient was transferred to an inpatient setting after 7 days of abnormal temperature (above 38°C). Lymphopenia, increased ESR (43 mm/h) were observed. Biochemical parameters also had deviations: the level of LDG was 606 U/l (the upper limit of the norm of 450 U/l), the level of IL-6 was slightly increased - 16.0 pg/ml (the norm of 0-10 pg/ml). At this stage of the disease, Novoclav was used to prevent bacterial infection, Dexamethasone, Cibor, and Hydroxychloroquine. After a week, the patient's condition worsened significantly. Shortness of breath was observed, body temperature remained at 38.5°C, saturation decreased to 77%, the content of IL-6 exceeded 300 pg/ml, procalcitonin increased to 0.5 µg/l, C-reactive protein - to 67.5 mg/l, ferritin - up to 579 mg/ml that appropriated to the manifestation of symptoms of cytokine storm. An administration of the immunotropic drug Tocilizumab within the next three days did not cause the decrease of parameters. The patient was begun non-invasive ventilation of lungs with the simultaneous appointment of another blocker of IL-6 - arthralgia (64 mg). During a day, the concentration of C-reactive protein and IL-6 decreased to normal. A week later, the patient's condition became satisfactory, and she was discharged from the hospital with CT3 pulmonary lesion. We can say that the use of clinical biomarkers of inflammation (C-reactive protein and IL-6) allows us to make an individual program in the treatment of severe cases of coronavirus infection.

**Key words:** coronavirus, clinical signs, cytokine storm, therapy, antiviral drugs, Hydroxychloroquine, Tocilizumab.

Коронавирус SARS-CoV-2 относится к линии Beta-CoV семейства *Coronaviridae* и представляет собой одноцепочечный РНК-содержащий вирус. В настоящее время существует множество протоколов лечения от данной вирусной инфекции в зависимости от стадии заболевания и тяжести состояния пациента (коморбидный и мультикоморбидный статусы). Тактика лечения зависит от сопутствующих заболеваний и возраста пациента. Маркерами тяжести протекания заболевания являются повышение температуры тела на длительный период (2-4 недели), снижение сатурации крови SpO<sub>2</sub>, измеряемой с помощью пульсоксиметра, ниже 95%, КТ-картина легких и другие. К клиническим маркерам болезни относятся нарушения свертываемости крови, уровень лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ), содержание лимфоцитов и С-реактивного белка (СРБ), повышение содержания железосодержащего белка ферритина и противовоспалительного цитокина – интерлейкина-6 (ИЛ-6), а также другие показатели крови [1; 2].

COVID-19 относится к системной инфекции, несмотря на то, что поражает легкие и дыхательные пути. В ходе заболевания у многих пациентов наблюдаются ухудшение состояния и других органов и систем, например, сердечно-сосудистой, иммунной, кроветворной, а также поражения ЖКТ и неврологические нарушения [3-5].

В настоящее время для лечения коронавирусной инфекции используются разнообразные лекарственные препараты, подавляющие нерегулируемый иммунный ответ организма, к числу которых в том числе относятся и гидроксихлорохин, тоцилизумаб и артралгия. Целью работы являлось исследование влияния вышеуказанных иммунотропных препаратов на лечение цито-

кинового шторма на примере индивидуального клинического случая.

Проводили исследования клинических и биохимических показателей крови в динамике у пациентки 66 лет, имеющей в анамнезе бронхиальную астму и онкологическое заболевание, с тяжелым протеканием коронавирусной инфекции.

Лечение проходило с 15.11.2020 г. по 1.12.2020 г. в отделении для лечения пациентов с коронавирусной инфекцией №2 БУЗ ВО «Воронежская областная клиническая больница №1».

Общий анализ крови проводили на гематологическом анализаторе Sysmex-ХТ-4000i. Для определения содержания СРБ, глюкозы, мочевины, креатинина, общего белка, АЛАТ, АСАТ и ЛДГ использовали автоматический анализатор Numastar 600. Тропонин I, Д-димер, ферритин определяли на автоматическом иммунохемилюминесцентном анализаторе IMMULITE 2000 XPi. Определение показателей гемостаза (фибриноген, тромбиновое время, активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ)) проводили на коагулометре Destyni Plus. Концентрацию прокальцитонина определяли с помощью иммунохроматографических тестов. Определение концентрации интерлейкина-6 проводили с использованием электрохемилюминесцентного иммуноанализа на тестах «Интерлейкин-6-ИФА-БЕСТ».

Пациентка в течение первой недели заболевания находилась дома, ее температура держалась на уровне 38.5°C, снижаясь на недолгий период под действием жаропонижающих препаратов до 37.3°C. После недельного пребывания в домашних условиях была сделана КТ, показавшая признаки двусторонней полисегментарной пневмонии (КТ2). Всего различают 4 степени поражения легких по степени тяжести, где КТ2 характеризует

ет пневмонию с вовлечением в патологический процесс 25-50% легких.

В результате пациентка была переведена в стационарные условия Воронежской областной

клинической больницы №1. При поступлении были сделаны клинический и биохимический анализы крови (табл. 1, 2).

Таблица 1

Показатели общего анализа крови у больной на разных сроках лечения

Показатель	Референтные пределы	Даты исследования		
		15.11.2020	21.11.2020	25.12.2020
Лейкоциты, 10 <sup>9</sup> /л	4.0-8.8	5.9	6.3	3.8
Эритроциты, 10 <sup>12</sup> /л	3.4-5.2	3.8	3.6	4.3
Гемоглобин, г/л	110.0-156.0	120.0	114.0	137.0
Гематокрит, %	31.5-46.0	37.0	32.0	42.1
Тромбоциты, 10 <sup>9</sup> /л	150.0-400.0	153.0	271.0	297.0
Гранулоциты, %	40.0-70.0	81.0	79.0	-
Лимфоциты, %	18.0-37.0	7.0	11.0	-
СОЭ, мм/час	2.0-20.0	43.0	53.0	5.0

Снижение содержания лимфоцитов через 7 суток с начала появления первых симптомов заболевания стало очевидным, при этом лейкопения не обнаруживалась. По литературным данным [6], в течение первых двух месяцев эпидемии в Китае лимфоцитопения наблюдалась у 83.2% заболевших, а лейкопения – у 33,7%.

При госпитализации у пациентки также отмечалось повышенное значение СОЭ – 43.0 мм/час. Так как этот показатель является неспецифическим и зависит от многих факторов, было измерено содержание СРБ, являющегося одним из маркеров легочного поражения, которое составило 120 мг/л при норме от 0 до 5.0. В.Е. Young et al. [7] было выявлено увеличение данного показателя у 60.7% пациентов, а при более тяжелом протекании заболевания – у 81.5% пациентов. Из литературных данных известно [8], что биомаркерами тяжести заболевания служат такие показатели сыворотки крови как содержание лактатдегидрогеназы (ЛДГ), прокальцитонина, ферритина и ИЛ-6. Уровень ЛДГ у пациентки был существенно повышен – до 606,0 ед/л (референтные значения 225.0-450.0 ед/л), а уровень ИЛ-6 был повышен незначительно – 16.0 пг/мл при норме 0-10 пг/мл. Поэтому на начальной стадии лечения применяли внутривенное введение новоклава с целью предотвращения бактериальной инфекции легких в течение 10 дней, а также дексаметазона в концентрации 20 мг 1 раз в сутки. Дексаметазон является глюкокортикоидным гормоном и применяется для лечения тяжелых форм пневмонии и гиперергических отклонений (цитокиновый шторм), обладает иммунодепрессивным действием и тормозит образование цитокинов [9].

Возможным и частым осложнением при коронавирусной инфекции являются нарушения свертываемости крови, за которые отвечают такие показатели как уровень Д-димера (продукт распада фибрина) ( $\geq 0.5$  мг/л), протромбиновое время, АЧТВ (активированное частичное тромбопластиновое время) и др. [10-12]. Для исключения подобных осложнений и предотвращения тромбоза глубоких вен, а также инфаркта миокарда и инсульта, пациентам вводят антикоагулянты. В частности, обследуемой пациентке профилактически вводили цибор подкожно по 2500 МЕ 1 раз в сутки 16 дней. Цибор является антикоагулянтом прямого действия (группа низкомолекулярных гепаринов), которые считаются более предпочтительными, чем антагонисты витамина К, из-за возможного взаимодействия последних с препаратами, применяемых при лечении COVID-19 [13].

В качестве ингибирующего ИЛ-6 препарата был использован гидроксихлорохин (200 мг 2 раза в сутки, 1 день, с последующим уменьшением концентрации до 100 мг в течение 5 дней). Гидроксихлорохин является умеренным иммуносупрессором, подавляющим синтез цитокинов. По литературным данным [14], введение препарата не оказывает существенного влияния на облегчение состояния пациентов, а также на развитие острого дистресс-синдрома и летальность.

Несмотря на предпринимаемые усилия, состояние пациентки к концу первой недели пребывания в стационаре ухудшилось: наблюдалось стабильное повышение температуры выше 38°C, нарастание одышки. Клинически это выражалось в увеличении содержания интерлейкина-6

выше 300 пг/мл, прокальцитонина – до 0.5 нг/мл, СРБ – до 67.5 мг/л (табл. 2). Содержание ферритина превысило верхнюю границу нормы сначала в 2.4 раза, а затем в 3.5 раза, что свидетельствовало о начале цитокинового шторма и значительном ухудшении состояния пациентки.

Тоцилизумаб (актема), являющийся моноклональным антителом, по данным исследователей [15; 16], осуществляет ингибирование ИЛ-6, являясь более действенным препаратом, чем гидроксихлорохин. Однако однократное введение актемы (162 мг) подкожно 20.11.2020 г. не привело к улучшению состояния, при этом сатурация крови снизилась до 77%. Пациентка была переведена на неинвазивную вентиляцию легких. Было решено применить отечественный препарат артлегия (олокизумаб), также относящийся к моноклональным антителам, блокирующим ИЛ-6, а не его рецепторы, рекомендованный МЗ для лечения коронавирусной инфекции. После подкожного введения препарата в переднюю брюшную стенку (64 мг) в течение суток уровень СРБ снизился до 10.4 мг/л, уровень АСТ снизился с 43 до 20 ед/л, а содержание интерлейкина-6 упало до 3.0 пг/мл. Одновременно, практически в течение 3-х часов, температура тела понизилась до нормальных значений. При этом содержание ферритина оставалось чрезвычайно высоким – 579.0 мг/л, медленно снизившись через 7 дней после ведения артлегии до 569.0 мг/л. К 30.11.2020 г. состояние пациентки стало удовлетворительным, и она была выписана из стационара с КТЗ объемом поражения легких, характеризующимся как среднетяжелая пневмония с поражением 50-75% легких. Нужно отметить, что при выписке содержание ферритина у пациентки осталось очень высоким – 569 мг/л (при верхней границе нормы 148.0), наблюдалась слабая тенденция к снижению. Было решено не вмешиваться в дальнейший процесс нормализации состояния иммунной системы и наблюдать за постепенным снижением уровня ферритина.

В настоящее время существует несколько препаратов для лечения COVID-19, кроме артлегии и актемы. В силу того, что артлегия является неспецифическим препаратом, применяемым при лечении артрита, ее заменили препаратом авифавир. Кроме того, найдено новое лекарство, применяемое при слабой и средней тяжести протекания болезни, – пегинтерферон лямбда, которое действует на уровень коронавирусной РНК [17]. В списке специфических препаратов остались фавипиравир, сарилумаб и другие [18; 19].

В результате исследований влияния трех противовоспалительных препаратов на цито-

киновый шторм было выявлено эффективное действие лишь одного из них – отечественного препарата артлегии. Следует отметить, что отслеживание биомаркеров [20; 21] воспаления в крови – ИЛ-6, СРБ, ферритина – в ходе проводимого противовирусного лечения, позволяет разработать точный и индивидуальный подход к интенсивной терапии для пациентов с тяжелой формой коронавирусной болезни, имеющих в анамнезе аллергическую астму [22] и другие факторы, влияющие на кормобидность.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На примере одного клинического случая показано влияние 3 иммунотропных препаратов: гидроксихлорохина, тоцилизумаба, артлегии на протекание цитокинового шторма при коронавирусной инфекции. Тактика лечения зависела от кормобидного статуса пациента. Использование клинических биомаркеров воспаления (СРБ и ИЛ-6) позволяет выработать индивидуальный подход в лечении тяжелых случаев коронавирусной инфекции.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors have no conflict of interests to declare.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Костинов М. П., Свитич О. А., Маркелова Е. В. Потенциальная иммунопрофилактика COVID-19 у групп высокого риска инфицирования. Временное пособие для врачей. М.: Группа МДВ; 2020.
2. Пашенков М. В., Хаитов М. Р. Иммунный ответ против эпидемических коронавирусов. Иммунология. 2020;41(5):5-18. doi:10.33029/0206-4952-2020-41-1-5-18.
3. Авдеев С. Н., Царева Н. А., Мерзоева З. М., Трущенко Н. В., Ярошецкий А. И. Практические рекомендации по кислородотерапии и респираторной поддержке пациентов с COVID-19 на дореанимационном этапе. Пульмонология. 2020;30(2):151-163. doi:10.18093/0869-0189-2020-30-2-151-163.
4. Charlson M. E., Pompei P., Ales K. L., Mac Kenzie C. R. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. J. Chronic. Dis. 1987;40(5):373-383. doi:10.1016/0021-9681(87)90171-8.
5. Явелов И. С., Драпкина О. М. COVID-19: состояние системы гемостаза и особенности антитромботической терапии. Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2020;19(3):310-318. doi:10.15829/1728-8800-2020-2571.
6. Wei-jie Guan, Zheng-yi Ni, Yu Hu, Wen-hua Liang, Chun-quan Ou, Jian-xing He, Lei Liu, Hong



Таблица 2

## Показатели биохимического анализа крови у больной на разных сроках лечения

Показатель	Референтные пределы	Даты взятия проб													
		15.11.2020	16.11.2020	17.11.2020	20.11.2020	21.11.2020	24.11.2020	27.11.2020	30.11.2020	25.12.2020					
Глюкоза, ммоль/л	4.2-6.4	5.9									6.6	4.7			5.42
Амилаза, ед/л	0.0-100.0	3.8									60.0	70.0			57.0
СРБ, мг/л	0.0-5.0	120.0								67.5	10.4	3.2		9.0	0.4
Общий белок, г/л	66.0-87.0	57.0									57.0			62.0	
Мочевина, ммоль/л	1.7-8.3	7.0									6.1				
Креатинин, мкмоль/л	44.0-115.0	94.0									84.0	76.0			52.3
АСТ, ед/л	0.0-31.0	43.0									20.0	26.0		21.0	17.7
АЛТ, ед/л	0.0-32.0	21.0									31.0	49.0		45.0	20.1
Билирубин общий, мкмоль/л	2.0-21.0	12.0									10.0	9.0			
Билирубин связанный, мкмоль/л	0.0-3.42	2.0									1.0	1.0			
Билирубин свободный, мкмоль/л	3.8-17.58	10.0									9.0	8.0			
ЛДГ, ед/л	225.0-450.0		606.0												
ИЛ-6, пг/мл	0.0-10.0		16.0				>300			>300	3.0				8.19
Тропонин I, мг/мл	0.0-1.0			до 0.2											
Ферритин, мг/л	5.0-148.0			362.0							579.0			569.0	
Прокальцитонин, мкг/л	0.0-0.5									0.5					
Альбумин, г/л	38.0-51.0										35.3				40.32
Фибриноген, г/л	1.75-4.0										3.81	2.62		3.53	
Протромбиновое отношение	0.9-1.3										0.91	0.88		0.93	
Протромбиновое время, сек	12.0-18.0										13.6	13.2		13.8	
АЧТВ, сек	22.6-35.0										24.7	23.7		27.2	
Тромбиновое время, сек	9.0-12.0										12.8	14.8		11.1	
Протромбинный индекс	80-100														87

- Shan, Chun-liang Lei, David S.C. Hui, Bin Du, Lan-juan Li, Guang Zeng, Kwok-Yung Yuen, Ru-chong Chen, Chun-li Tang, Tao Wang, Ping-yan Chen, Jie Xiang, Shi-yue Li, Jin-lin Wang, Zi-jing Liang, Yi-xiang Peng, Li Wei, Yong Liu, Ya-hua Hu, Peng Peng, Jian-ming Wang, Ji-yang Liu, Zhong Chen, Gang Li, Zhi-jian Zheng, Shao-qin Qiu, Jie Luo, Chang-jiang Ye, Shao-yong Zhu, Nan-shan Zhong. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *Engl. J. Med.* 2020;382(18):1708–1720. doi:10.1056/NEJMoa2002032.
7. Barnaby Edward Young, Sean Wei Xiang Ong, Shirin Kalimuddin, Jenny G. Low, Seow Yen Tan, Jiashen Loh, Oon-Tek Ng, Kalisvar Marimuthu, Li Wei Ang, Tze Minn Mak, Sok Kiang Lau, Danielle E. Anderson, Kian Sing Chan, Thean Yen Tan, Tong Yong Ng, Lin Cui, Zubaidah Said, Lalitha Kurupatham, Mark I-Cheng Chen, Monica Chan, Shawn Vasoo, Lin-Fa Wang, Boon Huan Tan, Raymond Tzer Pin Lin, Vernon Jian Ming Lee. Epidemiologic Features and Clinical Course of Patients Infected With SARS-CoV-2 in Singapore. *JAMA.* 2020;323(15):1488. doi:10.1001/jama.2020.3204.
8. Fei Zhou, Ting Yu, Ronghui Du, Guohui Fan, Ying Liu, Zhibo Liu, Jie Xiang, Yeming Wang, Bin Song, Xiaoying Gu, Lulu Guan, Yuan Wei, Hui Li, Xudong Wu, Jiuyang Xu, Shengjin Tu, Yi Zhang, Hua Chen, Bin Cao. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet.* 2020;395(10229):1054-1062. doi:10.1016/S0140-6736(20)30566-3.
9. Villar J., Ferrando C., Martínez D. Dexamethasone treatment for the acute respiratory distress syndrome: a multicentre, randomised controlled trial. *Lancet Respir Med.* 2020;8:267-276. doi:10.1016/S2213-2600(19)30417-5.
10. Chaolin Huang, Yeming Wang, Xingwang Li, Lili Ren, Jianping Zhao, Yi Hu, Li Zhang, Guohui Fan, Jiuyang Xu, Xiaoying Gu, Zhenshun Cheng, Ting Yu, Jiaan Xia, Yuan Wei, Wenjuan Wu, Xuelel Xie, Wen Yin, Hui Li, Min Liu, Yan Xiao, Hong Gao, Li Guo, Jungang Xie, Guangfa Wang, Rongmeng Jiang, Zhancheng Gao, Qi Jin, Jianwei Wang, Bin Cao. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet.* 2020;395(10223):497-506. doi:10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
11. Nanshan Chen, Min Zhou, Xuan Dong, Jieming Qu, Fengyun Gong, Yang Han, Yang Qiu, Jingli Wang, Ying Liu, Yuan Wei, Jia'an Xia, Ting Yu, Xinxin Zhang, Li Zhang. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet.* 2020;395(10223):507-513. doi: 10.1016/S0140-6736 (20) 30211-7.
12. Dawei Wang, Bo Hu, Chang Hu, Fangfang Zhu, Xing Liu, Jing Zhang, Binbin Wang, Hui Xiang, Zhenshun Cheng, Yong Xiong, Yan Zhao, Yirong Li, Xinghuan Wang, Zhiyong Peng. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus–Infected Pneumonia in Wuhan, China. *Journal of the American Medical Association.* 2020;323(11):1061-1069. doi:10.1001/jama.2020.1585.
13. Thachil J., Tang N., Gando S., Falanga A., Cattaneo M., Levi M., Clark C., Iba T. ISTH interim guidance on recognition and management of coagulopathy in COVID-19. *J. Thromb. Haemost.* 2020;18(5):1023-1026. doi:10.1111/jth.14810.
14. Yildirim F. Chloroquine and Hydroxychloroquine in Treatment of COVID-19 Disease. *J. Crit. Intensive Care.* 2020;11(1.1):23–26. doi.org/10.37678/dcybd.2020.2387
15. Salama C., Han J., Yau L., Reiss W. G., Kramer B., Neidhart J. D., Criner G.J., Kaplan-Lewis E., Baden R., Pandit L., Cameron M. L., Garcia-Diaz J., Chávez V., Mekebeb-Reuter M., Lima de Menezes F., Shah R., González-Lara M. F., Assman B., Freedman J., Mohan S. V. Tocilizumab in Patients Hospitalized with Covid-19 Pneumonia. *N. Engl. J. Med.* 2021;384(1):20-30. doi: 10.1056/NEJMoa2030340.
16. Coomes R. A., Haghbayan H. Interleukin-6 in COVID-19: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Rev. Med. Virol.* 2020;30(6):1-9. doi:10.1002/rmv.2141.
17. Kumada H., Suzuki F., Suzuki Y., Toyota J., Karino Y., Chayama K., Kawakami Y., Fujiyama S., Ito T., Itoh Y., Tamura E., Ueki T., Ishikawa H., Hu W., McPhee F., Linaberry M., E. Hughes E. Randomized Comparison of Daclatasvir + Asunaprevir Versus Telaprevir + Peginterferon/Ribavirin in Japanese Hepatitis C Virus Patients. *J. Gastroenterol Hepatol.* 2016;31(1):14-22. doi: 10.1111/jgh.13073.
18. Manli Wang, Ruiyuan Cao, Leike Zhang, Xinglou Yang, Jia Liu, Mingyue Xu, Zhengli Shi, Zhihong Hu, Wu Zhong, Gengfu Xiao. Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently. *Cell Research.* 2020;30(3):269-271. doi:10.1038/s41422-020-0282-0.
19. Beigel J. H., Tomashek K. M., Dodd L. E., Mehta A. K., Zingman B. S., Kalil A. C., Hohmann E., Chu H. Y., Luetkemeyer A., Kline S., Lopez de Castilla D., Finberg R. W., Dierberg K., Tapson V., Hsieh L., Patterson T. F., Paredes R., Sweeney D. A., Short W. R., Touloumi G., Lye D. C., Ohmagari N., Myoung-don Oh, Ruiz-Palacios G. M., Benfield T., Fätkenheuer G., Kortepeter M. G., Atmar R. L., Buddy Creech C., Lundgren J., Babiker A. G., Pett S., Neaton J.D., Burgess T. H., Bonnett T., Green M., Makowski M., Osinusi A., Nayak S., Lane H.

C. Remdesivir for the Treatment of Covid-19 — Final Report. *N. Engl. J. Med.* 2020;383(19):1813-1826. doi:10.1056/NEJMoa2007764.

20. Tanaka T., Kishimoto T. The biology and medical implications of interleukin-6. *Cancer Immunol Res.* 2014;2(4):288-294. doi:10.1158/2326-6066.CIR-14-0022.

21. Rossi J.-F., Lu Z.-Y., Jourdan M., Klein B. Interleukin-6 as a therapeutic target. *Clinical Cancer Research.* 2015;21(6):1248-1257. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-2291

22. Johnston S. L. Asthma and COVID-19: Is asthma a risk factor for severe outcomes? *Allergy.* 2020;75(7):1543-1545. doi:10.1111/all.14348.

## REFERENCES

1. Kostinov M. P., Svitich O. A., Markelova E. V. Potential prophylaxis of COVID-19 in high risk groups. Temporary manual for the doctors. M.: Gruppya MDV; 2020. (In Russ.).

2. Paschenkov M. V., Khaitov M. R. Immune response against epidemic coronaviruses. *Immunology.* 2020;41(5):5-18. (In Russ.). doi:10.33029/0206-4952-2020-41-1-5-18.

3. Avdeev S. N., Tsareva N. A., Merzhoeva Z. M., Trushenko N. V., Yarosheckij A. I. Practical guidance for oxygen treatment and respiratory support of patients with COVID-19 infection before admission to intensive care unit. *Pulmonology.* 2020;30(2):151-163. (In Russ.) doi:10.18093/0869-0189-2020-30-2-151-163.

4. Charlson M. E., Pompei P., Ales K. L., Mac Kenzie C. R. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. *J. Chronic. Dis.* 1987;40(5):373-383. doi:10.1016/0021-9681(87)90171-8.

5. Yavelov I. S., Drapkina O. M. COVID-19: hemostatic parameters and specifics of antithrombotic treatment. *Cardiovascular Therapy and Prevention.* 2020;19(3):310-318. (In Russ.). doi:10.15829/1728-8800-2020-2571

6. Wei-jie Guan, Zheng-yi Ni, Yu Hu, Wen-hua Liang, Chun-quan Ou, Jian-xing He, Lei Liu, Hong Shan, Chun-liang Lei, David S.C. Hui, Bin Du, Lan-juan Li, Guang Zeng, Kwok-Yung Yuen, Ru-chong Chen, Chun-li Tang, Tao Wang, Ping-yan Chen, Jie Xiang, Shi-yue Li, Jin-lin Wang, Zi-jing Liang, Yi-xiang Peng, Li Wei, Yong Liu, Ya-hua Hu, Peng Peng, Jian-ming Wang, Ji-yang Liu, Zhong Chen, Gang Li, Zhi-jian Zheng, Shao-qin Qiu, Jie Luo, Chang-jiang Ye, Shao-yong Zhu, Nan-shan Zhong. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *Engl. J. Med.* 2020;382(18):1708 –1720. doi:10.1056/NEJMoa2002032.

7. Barnaby Edward Young, Sean Wei Xiang Ong, Shirin Kalimuddin, Jenny G. Low, Seow

Yen Tan, Jiashen Loh, Oon-Tek Ng, Kalisvar Marimuthu, Li Wei Ang, Tze Minn Mak, Sok Kiang Lau, Danielle E. Anderson, Kian Sing Chan, Thean Yen Tan, Tong Yong Ng, Lin Cui, Zubaidah Said, Lalitha Kurupatham, Mark I-Cheng Chen, Monica Chan, Shawn Vasoo, Lin-Fa Wang, Boon Huan Tan, Raymond Tzer Pin Lin, Vernon Jian Ming Lee. Epidemiologic Features and Clinical Course of Patients Infected With SARS-CoV-2 in Singapore. *JAMA.* 2020;323(15):1488. doi:10.1001/jama.2020.3204.

8. Fei Zhou, Ting Yu, Ronghui Du, Guohui Fan, Ying Liu, Zhibo Liu, Jie Xiang, Yeming Wang, Bin Song, Xiaoying Gu, Lulu Guan, Yuan Wei, Hui Li, Xudong Wu, Jiuyang Xu, Shengjin Tu, Yi Zhang, Hua Chen, Bin Cao. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet.* 2020;395(10229):1054-1062. doi:10.1016/S0140-6736(20)30566-3.

9. Villar J., Ferrando C., Martínez D. Dexamethasone treatment for the acute respiratory distress syndrome: a multicentre, randomised controlled trial. *Lancet Respir Med.* 2020;8:267-276. doi:10.1016/S2213-2600(19)30417-5.

10. Chaolin Huang, Yeming Wang, Xingwang Li, Lili Ren, Jianping Zhao, Yi Hu, Li Zhang, Guohui Fan, Jiuyang Xu, Xiaoying Gu, Zhenshun Cheng, Ting Yu, Jiaan Xia, Yuan Wei, Wenjuan Wu, Xuelei Xie, Wen Yin, Hui Li, Min Liu, Yan Xiao, Hong Gao, Li Guo, Jungang Xie, Guangfa Wang, Rongmeng Jiang, Zhancheng Gao, Qi Jin, Jianwei Wang, Bin Cao. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet.* 2020;395(10223):497-506. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.

11. Nanshan Chen, Min Zhou, Xuan Dong, Jieming Qu, Fengyun Gong, Yang Han, Yang Qiu, Jingli Wang, Ying Liu, Yuan Wei, Jia'an Xia, Ting Yu, Xinxin Zhang, Li Zhang. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet.* 2020;395(10223):507-513. doi: 10.1016/S0140-6736 (20) 30211-7.

12. Dawei Wang, Bo Hu, Chang Hu, Fangfang Zhu, Xing Liu, Jing Zhang, Binbin Wang, Hui Xiang, Zhenshun Cheng, Yong Xiong, Yan Zhao, Yirong Li, Xinghuan Wang, Zhiyong Peng. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus–Infected Pneumonia in Wuhan, China. *Journal of the American Medical Association.* 2020;323(11):1061-1069. doi:10.1001/jama.2020.1585.

23. 20. Thachil J., Tang N., Gando S., Falanga A., Cattaneo M., Levi M., Clark C., Iba T. ISTH interim guidance on recognition and management

- of coagulopathy in COVID-19. *J. Thromb. Haemost.* 2020;18(5):1023-1026. doi:10.1111/jth.14810.
13. Yildirim F. Chloroquine and Hydroxychloroquine in Treatment of COVID-19 Disease. *J. Crit. Intensive Care.* 2020;11(1.1):23-26. doi.org/10.37678/dcybd.2020.2387
14. Salama C., Han J., Yau L., Reiss W.G., Kramer B., Neidhart J.D., Criner G.J., Kaplan-Lewis E., Baden R., Pandit L., Cameron M.L., Garcia-Diaz J., Chávez V., Mekebeb-Reuter M., Lima de Menezes F., Shah R., González-Lara M.F., Assman B., Freedman J., Mohan S.V. Tocilizumab in Patients Hospitalized with Covid-19 Pneumonia. *N. Engl. J. Med.* 2021;384(1):20-30. doi:10.1056/NEJMoa2030340.
15. Coomes R. A., Haghbayan H. Interleukin-6 in COVID-19: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Rev. Med. Virol.* 2020;30(6):1-9. doi:10.1002/rmv.2141.
16. Kumada H., Suzuki F., Suzuki Y., Toyota J., Karino Y., Chayama K., Kawakami Y., Fujiyama S., Ito T., Itoh Y., Tamura E., Ueki T., Ishikawa H., Hu W., McPhee F., Linaberry M., E. Hughes E. Randomized Comparison of Daclatasvir + Asunaprevir Versus Telaprevir + Peginterferon/Ribavirin in Japanese Hepatitis C Virus Patients. *J. Gastroenterol Hepatol.* 2016;31(1):14-22. doi:10.1111/jgh.13073.
17. Manli Wang, Ruiyuan Cao, Leike Zhang, Xinglou Yang, Jia Liu, Mingyue Xu, Zhengli Shi, Zhihong Hu, Wu Zhong, Gengfu Xiao. Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently. *Cell Research.* 2020;30(3):269-271. doi.org/10.1038/s41422-020-0282-0.
18. Beigel J. H., Tomashek K. M., Dodd L. E., Mehta A. K., Zingman B. S., Kalil A. C., Hohmann E., Chu H. Y., Luetkemeyer A., Kline S., Lopez de Castilla D., Finberg R. W., Dierberg K., Tapson V., Hsieh L., Patterson T.F., Paredes R., Sweeney D. A., Short W. R., Touloumi G., Lye D. C., Ohmagari N., Myoung-don Oh, Ruiz-Palacios G. M., Benfield T., Fätkenheuer G., Kortepeter M. G., Atmar R. L., Buddy Creech C., Lundgren J., Babiker A. G., Pett S., Neaton J. D., Burgess T. H., Bonnett T., Green M., Makowski M., Osinusi A., Nayak S., Lane H.C. Remdesivir for the Treatment of Covid-19 — Final Report. *N. Engl. J. Med.* 2020;383(19):1813-1826. doi:10.1056/NEJMoa2007764.
19. Tanaka T., Kishimoto T. The biology and medical implications of interleukin-6. *Cancer Immunol Res.* 2014;2(4):288-294. doi:10.1158/2326-6066.CIR-14-0022.
20. Rossi J.-F., Lu Z.-Y., Jourdan M., Klein B. Interleukin-6 as a therapeutic target. *Clinical Cancer Research.* 2015;21(6):1248-1257. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-2291.
21. Johnston S. L. Asthma and COVID-19: Is asthma a risk factor for severe outcomes? *Allergy.* 2020;75(7):1543-1545. doi:10.1111/all.14348.

УДК: 616.61

DOI: 10.37279/2224-6444-2021-11-3-85-92

## ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ МАРКЕРЫ РЕЦИДИВИРОВАНИЯ МОЧЕКАМЕННОЙ БОЛЕЗНИ И РОЛЬ ИНГИБИТОРОВ КАМНЕОБРАЗОВАНИЯ ПРИ РЕЦИДИВИРУЮЩЕМ КАЛЬЦИЙ-ОКСАЛАТНОМ НЕФРОЛИТИАЗЕ

Буданов А. А.<sup>1</sup>, Медведев В. Л.<sup>1,2</sup>, Курзанов А. Н.<sup>1</sup>, Быков И. М.<sup>1</sup>, Басов А. А.<sup>1</sup>, Русинова Т. В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 350063, улица Седина 4, Краснодар, Россия

<sup>2</sup>ГБУЗ «Научно-исследовательский институт – Краевая больница №1 им. проф. С.В. Очаповского» Министерства здравоохранения Краснодарского края, 350086, улица 1 Мая 167, Краснодар, Россия

Для корреспонденции: Буданов Артем Андреевич, ассистент кафедры урологии ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет», e-mail: artembudanov2203@gmail.com

For correspondence: Artem A. Budanov, assistant of the department of urology Kuban state medical university, e-mail: artembudanov2203@gmail.com

### Information about authors:

Budanov A. A., <http://orcid.org/0000-0002-9126-1649>

Medvedev V. L., <http://orcid.org/0000-0001-8335-2578>

Kurzanov A. N., <https://orcid.org/0000-0002-0566-256X>

Bykov I. M., <http://orcid.org/0000-0002-1787-0040>

Basov A. A., <http://orcid.org/0000-0002-2262-4549>

Rusinova T. V., <http://orcid.org/0000-0003-2962-3212>

### РЕЗЮМЕ

Мочекаменная болезнь (почечнокаменная болезнь, нефролитиаз) является частым заболеванием, лечение которого в современное время является серьезной задачей систем здравоохранения не только в России, но и во всём мире. При этом камни кальций-оксалатной природы, являются наиболее часто встречающимися конкрементами у пациентов с данной патологией – примерно в 70-80% случаев. Также стоит отметить, что данное заболевание не только обладает достаточно болезненными проявлениями и требует больших финансовых затрат для лечения, но и имеет сложный многофакторный многоступенчатый патогенез, понимание механизмов которого может дать ключ к разработке наиболее успешной терапии. Сам патогенез состоит из нескольких этапов, таких как нуклеация с формированием центра кристаллизации, рост кристаллов, агрегация и их прикрепление к поверхности эпителиальных клеток.

Известно, что организм человека имеют различные вещества, влияющие на процессы камнеобразования. Так, промоторы камнеобразования облегчают их кристаллизацию, а ингибиторы предотвращают её. Между промоторами и ингибиторами имеется тонкое равновесие, и их дисбаланс зачастую является решающим фактором патогенеза. По химической природе ингибиторы могут быть как неорганическими, так и органическими (белки, гликозаминогликаны) веществами. Последние особенно привлекают внимание, так как при различных концентрациях они могут выступать как ингибиторами, так и промоторами камнеобразования. Для полного понимания механизмов образования кальций-оксалатных камней в данном обзоре проводится анализ современных данных об ингибиторах рецидивирующего нефролитиаза и их роль в патофизиологии процесса образования почечных камней.

**Ключевые слова:** нефролитиаз, ингибиторы камнеобразования, кальций-оксалатные камни, белок Тамма-Хорсфалла, нефрокальцин, альбумин, остеопонтин.

### POTENTIAL MARKERS OF RECURRENCE OF UROLITHIASIS DISEASE AND THE ROLE OF STONE FORMATION INHIBITORS IN RECURRENT CALCIUM OXALATE NEPHROLITHIASIS

Budanov A. A.<sup>1</sup>, Medvedev V. L.<sup>1,2</sup>, Kurzanov A. N.<sup>1</sup>, Bykov I. M.<sup>1</sup>, Basov A. A.<sup>1</sup>, Rusinova T. V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Kuban State Medical University, Krasnodar, Russia

<sup>2</sup>Research Institute – Regional Hospital No. 1 named after prof. S.V. Ochapovsky; Krasnodar, Russia

### SUMMARY

Nowadays urolithiasis (nephrolithiasis) is a common disease, which treatment is a serious task of health care services not only in Russia, but throughout the world. At the same time, stones of a calcium-oxalate nature are the most common stones in patients with this pathology – in about 70-80% of cases. It is also worth noting that this disease not only has rather painful manifestations, and its treatment requires large financial costs, but also has a complex multifactorial multistage pathogenesis, understanding the mechanisms of which can provide a key to the development of the most successful therapy. Pathogenesis itself consists of several stages, such as nucleation with the formation of a crystallization center, crystal growth, aggregation and their attachment to the surface of epithelial cells.

It is known that the human body contains various substances that affect the processes of stone formation. Thus, stone formation promoters facilitate their crystallization, and inhibitors prevent it. There is a delicate balance between promoters and inhibitors, and their imbalance is often a decisive factor in pathogenesis. By their chemical nature, inhibitors can be both inorganic and organic (proteins, glycosaminoglycans) substances. The latter are especially at-

tracting attention, since at various concentrations they can act as both inhibitors and promoters of stone formation. To fully understand the mechanisms of calcium oxalate stone formation, this review analyzes current data on inhibitors of recurrent nephrolithiasis and their role in the pathophysiology of the process of renal stone formation.

**Key words: nephrolithiasis, inhibitors of stone formation, calcium oxalate stones, Tamm-Horsfall protein, nephrocalcin, albumin, osteopontin.**

Нефролитиаз является сегодня одним из самых распространённых урологических заболеваний и отличается тем, что даёт тяжёлые осложнения. Известно, что примерно у 75% пациентов с мочекаменной болезнью камни содержат кристаллы моногидрата или дигидрата оксалата кальция, возможна смесь этих веществ [1]. Хотя кристаллы фосфата кальция или гидроксипатиты также часто входят в состав камней, однако они в основном представлены там в качестве второстепенных компонентов и редко составляют большую часть кристаллической фракции [2]. Образование таких камней – процесс, зависящий от многочисленных факторов, таких как концентрация ионов, образующих камни, содержание хелатов (например, цитрата, снижающего концентрацию свободных ионов оксалата кальция), и ионная сила, понижающая активность этих ионов [3]. Немаловажную роль играют белки и другие органические компоненты, которые покрывают поверхность почти каждого микрокристалла в кальций-оксалатных камнях [4], хотя общее содержание органических веществ обычно составляет всего 2-3% от общей массы образующихся камней. В основном эти компоненты представлены гликопротеинами и реже гликозаминогликанами [5]. На сегодняшний день описано свыше 100 таких соединений и зачастую их функции неизвестны [3]. Сейчас достоверно известно, что к образованию почечных камней имеют отношение 11 белков [6], к которым относятся белок Тамма-Хорсфалла (также известный как уромодулин), нефрокальцин, альбумин [7], остеопонтин (уропонтин), кальгранулин, гиалуроновая кислота [8], аннексин II, матричный Gla-протеин, фрагмент мочевого протромбина 1 (UPTF1 [9]), фактор трилистника 1 (TNF1) и ингибитор интер- $\alpha$ -трипсина (легкая цепь бикунина [10]).

Белковые «плёнки» обладают двоякими свойствами. В случае нефролитиаза взаимодействия между этими компонентами мочи и кальций-оксалатными кристаллами могут влиять на зарождение кристаллов, рост, агрегацию и прикрепление кристаллов (и/или агрегатов) к эпителиальным поверхностям канальцев почек [2]. Так, в некоторых исследованиях сообщается, что макромолекулы в моче способствуют агрегации моногидратов оксалатов кальция и их прикреплению к эпителиальным клеткам [3]. В то же время, различные компоненты мочи яв-

ляются ингибиторами агрегации кристаллов, в особенности анионные белки и гликозаминогликаны [11]. Первое может объясняться тем, что адсорбированные на поверхности кристаллов моногидратов оксалатов кальция полианионные белки могут препятствовать образованию крупных конгломератов из-за изменения формы кристаллов, ингибированию их роста и изменению направления кристаллизации в сторону дигидратов оксалатов кальция, являющихся термодинамически менее стабильными кристаллическими структурами, которые, по-видимому, менее способны к камнеобразованию [12]. Усиление же камнеобразования объясняется возможностью полианионных белков облегчать прикрепление кристаллов моногидратов оксалатов кальция к поверхностям клеток почек [2], а также способностью индукции моногидратов оксалатов кальция к самоагрегированию. При этом катионные макромолекулы, также взаимодействующие с кристаллами моногидратов оксалатов кальция, могут приводить к взаимодействию типа «полианион-поликатион», которое вызывает агрегацию кристаллов [13].

Таким образом, на данный момент имеются противоречивые данные о функциях белковых макромолекул по отношению к кальций-оксалатным кристаллам, что подтверждает необходимость более глубокого анализа свойств основных белковых макромолекул и отражено в данной работе.

### 1. Белок Тамма-Хорсфалла

Белок Тамма-Хорсфалла (БТХ), или уромодулин, является почечным гликопротеином всех плацентарных животных [14], наиболее распространённым белком в моче человека [14] и одним из первых идентифицированных компонентов матрикса почечных камней. Известно, что мономер БТХ имеет молекулярный вес около 80 кДа, сам же полимерный белок – до нескольких миллионов Да. Синтез данного белка происходит исключительно в толстой восходящей части петли Генле [15]. У человека данный белок экскретируется в количестве 20-100 мг в сутки. Первоначально у БТХ была описана функция ингибирования вирусной гемагглютинации [15], однако сейчас известно, что данный белок играет очень важную роль в патогенезе образования мочевых камней. Тем не менее, его точный вклад в развитие мочекаменной болезни пока недостаточно ясен, а результаты различных

исследований противоречивы в отношении его патогенетической роли. Так, в одних исследованиях было показано, что БТХ является промотором кристаллизации кальций-оксалатных и кальций-фосфатных камней [16], в то время как другие работы демонстрируют, что данный белок не способствует такой кристаллизации и не влияет на спонтанное осаждение неорганических веществ [17]. Более того, путем «нокаута» гена БТХ у мышей в одной из работ продемонстрировано, что содержание данного белка ниже нормы не только приводит к образованию конкрементов в почках, но и к большей предрасположенности к бактериальным инфекциям мочевыводящих путей.

Такая двойственная роль БТХ может объясняться его уникальными физико-химическими свойствами: при высоком значении рН и низкой ионной силе он является мощным ингибитором агрегации кристаллов, тогда как при более низких значениях рН и высокой ионной силе увеличивающийся показатель вязкости БТХ приводит к снижению ингибирования агрегации кристаллов. При этом при наличии дополнительных ионов кальция молекулы БТХ становятся сильными промоторами агрегации кристаллов оксалатов кальция. Данное свойство выражено в большей степени у пациентов с рецидивирующей формой МКБ, у которых БТХ демонстрирует аномально высокую тенденцию к полимеризации.

Возможно, что камнеобразование в большей степени связано с типом экскретируемого БТХ, чем с его количеством. Этот факт лёг в основу гипотезы о том, что тип БТХ у пациентов с мочекаменной болезнью (МКБ) отличается от БТХ у здоровых людей. Выделенный из мочи таких пациентов БТХ содержал в своём составе меньше гетероолигосахаридов (в основном, сиаловой кислоты), чем белок, полученный у испытуемых контрольной группы. Исследования также показывали зависимость между содержанием сиаловой кислоты в белке и значением его поверхностного заряда, что связано с различными показателями сиалирования БТХ у пациентов с МКБ и здоровых людей [18].

Таким образом, способность БТХ к самополимеризации может способствовать либо гетерогенному зарождению конкрементов, либо, в случае потери его отрицательного заряда в связи с десилированием, уменьшением рН, возрастанием осмолярности и при других воздействиях, к агрегации белка в крупные структуры, являющиеся центрами образования кристаллов оксалатов достаточно больших размеров, что может приводить к блокированию просветов почечных канальцев. Однако, на данный момент необхо-

димы дальнейшие исследования этого процесса для выяснения роли БТХ в этиологии нефролитиаза.

## 2. Нефрокальцин

На втором месте после БТХ наиболее широко изучен белок нефрокальцин, участвующий в образовании почечных конкрементов. По данным различных источников нефрокальцин является одним из основных ингибиторов кристаллизации оксалата кальция в моче [19], а его ингибирующая активность составляет примерно 90% от общего действия всех ингибиторов камнеобразования на кристаллизацию оксалата кальция. Молекулярная масса нефрокальцина широко варьирует в зависимости от агрегации белка, при этом молекулярные массы мономера, димера, тримера и тетрамера составляют 14-15, 23-30, 45-48 и 60-68 кДа соответственно. Существует по меньшей мере четыре изоформы нефрокальцина, а именно NC-A, NC-B, NC-C и NC-D. Белок расположен в эпителии проксимальных канальцев почек и в толстой восходящей части петель Генле почек млекопитающих [20]. Этот гликопротеин находится в моче в концентрациях 5-16 мг/л и содержит в своей структуре 2-3 остатка  $\gamma$ -карбоксиглутаминовой кислоты [21].

На данный момент известно, что изоформы NC-A и NC-B являются сильными ингибиторами образования, роста и агрегации кристаллов моногидрата оксалата кальция, тогда как изоформы NC-C и NC-D обладают противоположным промоторным действием [21].

## 3. Альбумин

Альбумин является одним из наиболее распространённых белков мочи [22] и обнаружен в матриксе различных мочевых камнях [23]. Известно о его способности связываться с оксалатом кальция, а также с кристаллами мочевой кислоты [24], не подавляя их рост. Альбумин также обладает способностью связывать некоторые белки мочи. Стоит отметить, что белки мочи, которые проявляют большое сродство к альбумину, также входят в состав матрикса мочевых камней. Предполагается, что белки становятся частью матрикса, связываясь с альбуминами на поверхности кристаллов оксалата кальция. Также предполагается, что в отличие от других связывающих кальций белков мочи, альбумин взаимодействует с кальцием через свою карбоксильную группу.

## 4. Остеопонтин

Остеопонтин (уропонтин) – гликопротеин, отрицательно заряженный за счёт большого количества аспарагиновой кислоты, который непосредственно участвует в регуляции как физиологической, так и патологической минерализации. Молекулярная масса этого белка составляет при-

мерно 44-75 кДа [15]. Остеопонтин представляет собой фосфорилированный белок, который обнаруживается в достаточно низких концентрациях в костной, эпителиальной и почечной тканях, он производится различными клетками, например, макрофагами, гладкомышечными клетками, активированными Т-клетками и эндотелиальными клетками и, кроме этого, входит в состав органического матрикса почечных камней [15]. Остеопонтин также синтезируется в почках и присутствует в моче человека [26].

Данный белок участвует в различных биологических процессах, таких как воспаление, репарация, дифференциация различных клеток [27]. По отношению его роли в нефролитиазе можно отметить, что он обладает такой же двойственной природой, как и БТХ. Так, исследования *in vitro* показывают, что остеопонтин является мощным ингибитором зарождения, роста и агрегации кристаллов кальций-оксалатной природы [28]. Результаты экспериментов показывали, что данный белок покрывает кристаллы моногидрата оксалатов кальция и подавляет их адгезию к почечным эпителиальным клеткам [29]. Точный механизм, с помощью которого остеопонтин влияет на процесс кристаллизации, изучен не полностью – например, известно, что мыши с нокаутом гена остеопонтина были более подвержены к мочекаменной болезни, чем мыши контрольной группы [30]. Однако клинические исследования показали, что экскреция остеопонтина у пациентов с МКБ была меньше, чем у пациентов контрольной группы, что, вероятно, объясняется включением данного белка в состав почечных камней [15]. Однако в клинических исследованиях пока нет достоверных доказательств связи между остеопонтином и МКБ. Достоверно известно лишь то, что остеопонтин в меньшей степени присутствует в составе почечных камней на основе из дигидрата оксалата кальция, чем в камнях, состоящих в основном из его моногидрата.

Таким образом, можно сделать вывод, что остеопонтин может играть важную роль в ингибировании образования кальций-оксалатных камней в почках; однако в необходимы дополнительные клинические испытания для подтверждения данной гипотезы.

### 5. Кальгранулин

Кальгранулин представляет собой кальций-связывающий белок с молекулярной массой до 20 кДа, являющийся членом семейства белков S100, которые представляют собой небольшие кислые белки, широко распространённые в организме и участвующие в регуляции развития организма [31]. Также эти белки участвуют в ряде заболеваний [32]. Сам же кальгранулин присут-

ствует в почках и моче человека и может подавлять рост кальций-оксалатных кристаллов [33]. Было доказано, что кальгранулин в чистом виде подавлял как рост кальций-оксалатных кристаллов, так и их агрегацию в наномолярном диапазоне [34]. Ингибирующие свойства кальгранулина могут быть связаны с его способностью связываться с поверхностью кристалла, однако, так же, как и в случае с БТХ и остеопонтином, кальгранулин был обнаружен в самом матриксе почечных камней различных типов, в том числе, в камнях из оксалата кальция и мочевой кислоты, в инфекционных или струвитных камнях, а также в отложениях фосфата кальция [35].

### 6. Гиалуриновая кислота

Гиалуриновая кислота (ГК) представляет собой линейный гликозаминогликан (ГАГ), который состоит из нескольких единиц глюкуроновой кислоты и N-ацетилглюкозамина [36]. Это очень большой и высокомолекулярный ГАГ, представляющий собой цепь из более чем 2500 повторов дисахарида, каждый из которых имеет примерную массу около 400 Да [37]. ГК является основным компонентом внеклеточного матрикса (ВКМ) в мозговом веществе почек и перичеселлюлярного матрикса митоген-активируемых клеток почечных канальцев. Такие характеристики ГК, как размер, отрицательный ионный заряд и способность образовывать гидратированные гелеподобные структуры, позволяют ей легко связываться с оксалатными кристаллами. Такое связывание приводит к задерживанию кристаллов в почечных канальцах и образованию кальцинированных бляшек в почечном интерстиции (бляшки Рэндалла). ГК также напрямую влияет на клетки благодаря своей способности связываться через рецепторы на её поверхности, такие как CD44 и CD168.

Было высказано предположение, что гиалуриновая кислота может быть ингибитором кристаллизации, пока соли кальция находятся в растворе, так как карбоксильные группы цепей гиалуриновой кислоты не взаимодействуют с анионами (фосфатами и оксалатами), однако при адгезии уже сформировавшихся кристаллов гиалуриновая кислота может легко с ними связываться из-за её сродства с подобными кристаллами. Кроме того, в случае повреждения почечных клеток гиалуриновая кислота может действовать как промотор адгезии кристаллов к поверхности клеток, что в конечном итоге также приводит к образованию камней [38].

### 7. Аннексин II

Белок аннексин II является членом семейства кальций-зависимых фосфолипид-связывающих белков. Члены этого семейства играют роль в регуляции клеточного роста и в путях передачи



сигналов. Аннексины характеризуются консервативным СООН-концевым белковым «ядром», которое обеспечивает их мембранные и кальций-связывающие свойства [39]. Такое белковое «ядро» представляет собой цепь длиной около 70 аминокислот и содержит четыре повтора, каждый из которых состоит из кальций-связывающего мотива GXGT.

Аннексин II участвует в различных клеточных процессах, таких как подвижность клеток, связывание мембранно-ассоциированных белковых комплексов с актиновым цитоскелетом, эндоцитоз, фибринолиз, формирование ионных каналов и другие взаимодействия клеточного матрикса [40]. В 2003 году ученые обнаружили, что аннексин II является основным белком, связывающим кристаллы из моногидрата оксалатов кальция. Предполагается, что это является основным процессом, вызывающим последующие реакции, ведущие к образованию камней в почках. Также исследования показывают, что аннексин II может быть одной из нескольких молекул, связывающихся с кристаллами на поверхности клеток, одновременно модулируя удерживание кристаллов на них.

#### **8. Матриксный Gla-протеин**

Матриксный Gla-протеин (MGP) принадлежит к семейству внеклеточных минералосвязывающих белков, называемых Gla-белками, и является естественным ингибитором кальцификации сосудов [41]. MGP – витамин K-зависимый белок внеклеточного матрикса. Он был первоначально выделен из костей, сейчас известно, что он экспрессируется в лёгких, сердце, гладкомышечных клетках стенок кровеносных сосудов и почках [42]. И хотя впервые экспрессия мРНК MGP была зарегистрирована в костной ткани, она в десять раз выше в легких и сердце и в пять раз выше в почках [15]. MGP состоит из 84 аминокислот, который содержит пять остатков  $\gamma$ -карбоксиглутаминовой кислоты (Gla), которые обладают высоким сродством к ионам кальция [43].

Связь MGP с образованием почечных камней изучалась на культурах эпителиальных клеток почек, а также на животных моделях мочекаменной болезни. При этом отмечалась повышенная экспрессия гена MGP в культурах клеток, подвергшихся воздействию кристаллов на основе моногидратов оксалатов кальция. У людей связь MGP с камнеобразованием изучалась у пациентов с кальцификацией коронарных артерий. Было отмечено, что пациенты с данной патологией имели более низкие уровни MGP в сыворотке, чем пациенты контрольной группы [44].

#### **9. Фрагмент мочевого протромбина 1**

Протромбин, фактор свертывания крови, состоит из трёх фрагментов: тромбина, фрагмента

1 и фрагмента 2. Фрагмент 1 был назван фрагментом мочевого протромбина (UPTF1) из-за его высвобождения в моче [46]. Ранее обнаружено, что он избирательно связывается с кристаллами оксалатов кальция. Исследования *in vitro* также показывают, что UPTF1 представляет собой мощный ингибитор роста и агрегации этих кристаллов. Также отмечалось значительное увеличение его концентрации в почках у пациентов с МКБ по сравнению с контрольной группой. При сравнении ингибиторных свойств различных частей протромбина наиболее мощным действием обладает именно UPTF1, затем сам протромбин, фрагмент 2 (F2) и тромбин (T [47]). Такая ингибиторная активность объясняется наличием в белке домена Gla, который присутствует в протромбине и URTF1, но отсутствует в тромбине и F2. Кроме этого, такая эффективность URTF1 может объясняться более высоким отношением заряда к массе. Поскольку протромбин имеет такое же количество остатков Gla, что и URTF1, а молекулярная масса URTF1 значительно меньше, то, следовательно, и активность фрагмента 1 выше. Также некоторые исследования показывают, что сиалированные гликоформы URTF1 ингибируют рост и агрегацию кристаллов оксалатов кальция, возможно, покрывая поверхность этих кристаллов.

#### **10. Фактор трилистника человека 1**

Фактор трилистника человека 1 (THF1) принадлежит к семейству белков фактора трилистника. Он синтезируется эпителиальными клетками слизистой оболочки и экспрессируется в слизистой оболочке желудка, может действовать как мощный ингибитор роста кристаллов оксалата кальция [47]. Исследования TFF1 в моче показали, что его ингибирующая способность аналогична таковой у нефрокальцина. Ингибирующая активность TFF1 в моче зависит от дозы и подавляется антисывороткой к TFF1. Также TFF1 обладает способностью подавлять рост и агрегацию кристаллов оксалата кальция и может преобразовывать кристаллы моногидрата оксалата кальция в дигидратный тип.

#### **11. Ингибитор интер- $\alpha$ -трипсина**

Ингибитор интер- $\alpha$ -трипсина (I $\alpha$ I) представляет собой гликопротеин, состоящий из тяжелых цепей: H1 (60 кДа), H2 (70 кДа) и H3 (90 кДа), которые ковалентно связаны с одной легкой цепью, известной как бикунин (45 кДа). Бикунин является ингибитором протеаз широкого спектра действия и белком острой фазы. I $\alpha$ I и родственные ему молекулы, известные как семейство I $\alpha$ I, имеют отношение к различным патологическим состояниям, таким как воспалительные заболевания, рак, почечная недостаточность и мочекаменная болезнь. Белки

семейства IaI ингибируют кристаллизацию оксалатов кальция *in vitro* [48]. Воздействие этих кристаллов на эпителиальные клетки почек приводит к увеличению экспрессии мРНК бикунина. Известно, что бикунин в моче человека ингибирует зарождение и рост кристаллов оксалатов кальция и ингибирует адгезию кристаллов моногидрата оксалатов кальция на поверхности эпителиальных клеток почек

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение стоит сказать, что состав мочевых камней, образующихся при нефролитиазе, достаточно разнороден. Точный механизм образования камней пока до конца не выяснен, однако известно, что при нарушении метаболизма у пациентов происходит повышение уровня камнеобразующих веществ в сыворотке крови, что ведёт к последующему выделению их почками и перенасыщению мочи и, как следствие, выпадению солей в виде кристаллов и их дальнейшей агрегации. Вместе с тем не все люди с выявленным перенасыщением мочи имеют конкременты, так как их образование в большей степени связано с наличием в моче ингибиторов или промоторов камнеобразования. Для лучшего понимания патофизиологической и патохимической основы образования почечных камней необходимы дальнейшие исследования как основных белков, связанных с процессами камнеобразования, так и второстепенных макромолекул, чьи функции до сих пор ещё требуют уточнения.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors have no conflict of interests to declare.

**Финансирование.** Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №19-315-90089/19 «Аспиранты» от 02.09.2021 г., ГЗ МЗ РФ № 121022600268-0.

**Funding.** This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research, science project no. 19-315-90089/19 «Aspiranty» (Postgraduate Students) of September 2, 2019, the state assignment of the MH RF № 121022600268-0.

### ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Okada A., Ando R., Taguchi K. Identification of new urinary risk markers for urinary stones using a logistic model and multinomial logit model. *Clinical and Experimental Nephrology*. 2019;23(5):710–716. doi:10.1007/s10157-019-01693-x.
2. Rimer J. D., Kolbach-Mandel A. M., Ward M. D., Wesson J. A. The role of macromolecules in the formation of kidney stones. *Urolithiasis*. 2017;45(1):57-74. doi:10.1007/s00240-016-0948-8.

3. Baumann J. M., Casella R. Prevention of Calcium Nephrolithiasis: The Influence of Diuresis on Calcium Oxalate Crystallization in Urine. *Advances in Preventive Medicine*. 2019;2019:1-8. doi:10.1155/2019/3234867.

4. Baumann J. M., Affolter B. The paradoxical role of urinary macromolecules in the aggregation of calcium oxalate: a further plea to increase diuresis in stone metaphylaxis. *Urolithiasis*. 2016;44(4):311-317. doi:10.1007/s00240-016-0863-z.

5. Alelign T, Petros B. Kidney Stone Disease: An Update on Current Concepts. *Advances in Urology*. 2018;2018:1-12. doi:10.1155/2018/3068365.

6. Robertson W. G. Do «inhibitors of crystallisation» play any role in the prevention of kidney stones? A critique. *Urolithiasis*. 2017;45(1):43-56. doi:10.1007/s00240-016-0953-y.

7. Hattori C. M., Tiselius H. G., Heilberg I. P. Whey protein and albumin effects upon urinary risk factors for stone formation. *Urolithiasis*. 2017;45(5):421-428. doi:10.1007/s00240-017-0975-0.

8. Khan S. R., Canales B. K., Dominguez-Gutierrez P. R. Randall's plaque and calcium oxalate stone formation: role for immunity and inflammation. *Native Reviews Nephrology*. 2021;17(6):417-433. doi:10.1038/s41581-020-00392-1.

9. Tanaka Y., Okada A., Maruyama M., Tajiri R., Sugino T., Unno R., Taguchi K., Hamamoto S., Ando R., Yoshimura M., Mori Y., Kohri K., Yasui T. MP10-11 discovering spatial distribution and differential localization of protein matrix in calcium oxalate stones; a novel method of multifaceted structure analysis. *Journal of Urology*. 2020; 203(Supplement 4):129-130. doi:10.1097/JU.0000000000000830.011.

10. Ajeel M. A., Al-Mahdawi Z. M. M. Evaluation The role of Trefoil Factor 1 as early stage biomarker in patients with Nephrolithiasis. *Tikrit Journal of Pure Science*. 2018;23(9):16-19. doi:10.25130/tjps.23.2018.144.

11. Sayer J. A. Progress in Understanding the Genetics of Calcium-Containing Nephrolithiasis. *Journal of American Society of Nephrology*. 2017;28(3):748-759. doi:10.1681/ASN.2016050576.

12. Laffite G., Leroy C., Bonhomme C., Bonhomme-Courty L., Letavernier E., Daudon M., Frochot V., Haymann J. P., Rouzière S., Lucas I. T., Bazin D., Babonneau F., Abou-Hassan A. Calcium oxalate precipitation by diffusion using laminar microfluidics: toward a biomimetic model of pathological microcalcifications. *Lab on a Chip*. 2016;16(7):1157-1160. doi:10.1039/c6lc00197a.

13. Berger G. K., Eisenhauer J., Vallejos A., Hoffmann B., Wesson J. A. Exploring mechanisms of protein influence on calcium oxalate kidney stone formation. *Urolithiasis*. 2021:1-10. doi:10.1007/s00240-021-01247-5.

14. Attari V. E., Maddah A., Asl Z. S., Jalili M., Ardalan M. R., Mokari S. The association of serum uromodulin with allograft function and risk of urinary tract infection in kidney transplant recipients. *Journal of Renal Injury Prevention*. 2021;10(1):1-6. doi:10.34172/jrip.2021.02.

15. Khan A. Prevalence, pathophysiological mechanisms and factors affecting urolithiasis. *International Urology and Nephrology*. 2018;50(5):799-806. doi:10.1007/s11255-018-1849-2.
16. Micanovic R., LaFavers K., Garimella P. S., Wu X. R., El-Achkar T. M. Uromodulin (Tamm-Horsfall protein): guardian of urinary and systemic homeostasis. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2020;35(1):33-43. doi:10.1093/ndt/gfy394.
17. Schaeffer C., Devuyst O., Rampoldi L. Uromodulin: Roles in Health and Disease. *Annual Review of Physiology*. 2021;83:477-501. doi:10.1146/annurev-physiol-031620-092817.
18. Debroise T., Sedzik T., Vekeman J., Su Y., Bonhomme C., Tielens F. Morphology of calcium oxalate polyhydrates: a quantum chemical and computational study. *Crystal Growth & Design*. 2020;20(6):3807-3815. doi:10.1021/acs.cgd.0c00119.
19. Kelland M. A., Mady M. F., Lima-Eriksen R. Kidney stone prevention: dynamic testing of edible calcium oxalate scale inhibitors. *Crystal Growth & Design*. 2018;18(12):7441-7450. doi:10.1021/acs.cgd.8b01173.
20. Blay V., Li M. C., Ho S. P., Stoller M. L., Hsieh H. P., Houston D. R. Design of drug-like hepsin inhibitors against prostate cancer and kidney stones. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2020;10(7):1309-1320. doi:10.1016/j.apsb.2019.09.008.
21. García-Perdomo H. A., Solarte P. B., España P. P. Pathophysiology associated with forming urinary stones. *Urología Colombiana*. 2016;25(2):118-125. doi:10.1016/j.uroco.2015.12.013.
22. Zhao M., Yang Y., Guo Z., Shao C., Sun H., Zhang Y., Sun Y., Liu Y., Song Y., Zhang L., Li Q., Liu J., Li M., Gao Y., Sun W. A Comparative Proteomics Analysis of Five Body Fluids: Plasma, Urine, Cerebrospinal Fluid, Amniotic Fluid, and Saliva. *Proteomics – Clinical Application*. 2018;12(6):1800008. doi:10.1002/prca.201800008.
23. Priyadarshini, Raizada D., Kumar P., Singh T., Pruthi T., Negi A., Nigam L., Subbarao N. Exploring the modulatory effect of albumin on calcium phosphate crystallization. *Current Science*. 2019;117(6):1083. doi:10.18520/cs/v117/i6/1083-1089.
24. Haley W. E., Enders F. T., Vaughan L. E., Mehta R. A., Thoman M. E., Vrtiska T. J., Krambeck A. E., Lieske J. C., Rule A. D. Kidney function after the first kidney stone event. *Mayo Clinic Proceedings*. 2016;91(12):1744-1752. doi:10.1016/j.mayocp.2016.08.014.
25. Dobrek L. Physiological and pathophysiological implications of osteopontin and the diagnostic utility of the protein in kidney diseases. *Journal of Pre-Clinical and Clinical Research*. 2018;12(1):6-10. doi:10.26444/jpcrr/87075.
26. Kaleta B. The role of osteopontin in kidney diseases. *Inflammation Research*. 2019;68(2):93-102. doi:10.1007/s00011-018-1200-5.
27. Wasgewatte Wijesinghe D. K., Mackie E. J., Pagel C. N. Normal inflammation and regeneration of muscle following injury require osteopontin from both muscle and non-muscle cells. *Skelet Muscle*. 2019;9(1):6. doi:10.1186/s13395-019-0190-5.
28. Bhardwaj R., Bhardwaj A., Tandon C., Dhawan D. K., Bijarnia R. K., Kaur T. Implication of hyperoxaluria on osteopontin and ER stress mediated apoptosis in renal tissue of rats. *Experimental and Molecular Pathology*. 2017;102(3):384-390. doi:10.1016/j.yexmp.2017.04.002.
29. Gleberzon J. S., Liao Y., Mittler S., Goldberg H. A., Grohe B. Incorporation of osteopontin peptide into kidney stone-related calcium oxalate monohydrate crystals: a quantitative study. *Urolithiasis*. 2019;47(5):425-440. doi:10.1007/s00240-018-01105-x.
30. O'Kell A. L., Lovett A. C., Canales B. K., Gower L. B., Khan S. R. Development of a two-stage model system to investigate the mineralization mechanisms involved in idiopathic stone formation: stage 2 in vivo studies of stone growth on biomimetic Randall's plaque. *Urolithiasis*. 2019;47(4):335-346. doi:10.1007/s00240-018-1079-1.
31. Martelli C., Marzano V., Iavarone F., Huang L., Vincenzoni F., Desiderio C., Messina I., Beltrami P., Zattoni F., Ferraro P. M., Buchholz N., Locci G., Faa G., Castagnola M., Gambaro G. Characterization of the Protein Components of Matrix Stones Sheds Light on S100-A8 and S100-A9 Relevance in the Inflammatory Pathogenesis of These Rare Renal Calculi. *Journal of Urology*. 2016;196(3):911-918. doi:10.1016/j.juro.2016.04.064.
32. Bennett D., Salvini M., Fui A., Cillis G., Cameli P., Mazzei M. A., Fossi A., Refini R. M., Rottoli P. Calgranulin B and KL-6 in Bronchoalveolar Lavage of Patients with IPF and NSIP. *Inflammation*. 2019;42(2):463-470. doi:10.1007/s10753-018-00955-2.
33. Sohga A., Bigoniya P. A review on epidemiology and etiology of renal stone. *American Journal of Drug Discovery and Development*. 2017;7(2):54-62. doi:10.3923/ajdd.2017.54.62.
34. Marques S., Santos S., Fremin K., Fogo A. B. A case of oxalate nephropathy: when a single cause is not crystal clear. *American Journal of Kidney Diseases*. 2017;70(5): 722-724. doi:10.1053/j.ajkd.2017.05.022.
35. Robinson T. E., Hughes E. AB., Wiseman O. J., Stapley S. A., Cox S. C., Grover L. M. Hexametaphosphate as a potential therapy for the dissolution and prevention of kidney stones. *Journal of Materials Chemistry B*. 2020;8(24):5215-5224. doi:10.1039/d0tb00343c.
36. Felz S., Neu T. R., van Loosdrecht M. CM., Lin Y. Aerobic granular sludge contains Hyaluronic acid-like and sulfated glycosaminoglycans-like polymers. *Water Research*. 2020;169:115291. doi:10.1016/j.watres.2019.115291.
37. Mazzucco A. Hyaluronic Acid: Evaluation of Efficacy with Different Molecular Weights. *International Journal of Chemistry Research* 2018;1(1):13-18. doi:10.18689/ijcr-1000103 .
38. Manzoor M. A. P., Agrawal A. K., Singh B., Mujeeburahiman M., Rekha P. D. Morphological characteristics and microstructure of kidney stones using

- synchrotron radiation  $\mu$ CT reveal the mechanism of crystal growth and aggregation in mixed stones. *PLoS One*. 2019;3(14):e0214003. doi:10.1371/journal.pone.0214003.
39. Sønder S. L., Boye T. L., Tölle R., Dengjel J., Maeda K., Jäätelä M., Simonsen A. C., Jaiswal J. K., Nylandsted J. Annexin A7 is required for ESCRT III-mediated plasma membrane repair. *Scientific Reports*. 2019;9(1):1-12. doi:10.1038/s41598-019-43143-4.
40. Grewal T., Rentero C., Enrich C., Wahba M., Raabe C. A., Rescher U. Annexin Animal Models-From Fundamental Principles to Translational Research. *International Journal of Molecular Science*. 2021;22(7):3439. doi:10.3390/ijms22073439.
41. Bjørklund G., Svanberg E., Dadar M., Card D. J., Chirumbolo S., Harrington D. J., Aaseth J. The Role of Matrix Gla Protein (MGP) in Vascular Calcification. *Current Medical Chemistry*. 2020;27(10):1647-1660. doi:10.2174/0929867325666180716104159.
42. Gheorghe S. R., Crăciun A. M. Matrix Gla protein in tumoral pathology. *Medicine and Pharmacy Reports*. 2016;89(3):319-21. doi:10.15386/cjmed-579.
43. Ahmad S., Jan A. T., Baig M. H., Lee E. J., Choi I. Matrix gla protein: An extracellular matrix protein regulates myostatin expression in the muscle developmental program. *Life Sciences*. 2017;172:55-63. doi:10.1016/j.lfs.2016.12.011.
44. Barrett H., O’Keeffe M., Kavanagh E., Walsh M., O’Connor E. M. Is Matrix Gla Protein Associated with Vascular Calcification? A Systematic Review. *Nutrients*. 2018;10(4):415. doi:10.3390/nu10040415.
45. Borgen P. O., Reikeras O. Prothrombin fragment F1+2 in plasma and urine during total hip arthroplasty. *Journal of Orthopaedics*. 2017;14(4):475-479. doi:10.1016/j.jor.2017.08.001.
46. Sassanarakkit S., Peerapen P., Thongboonkerd V. StoneMod: a database for kidney stone modulatory proteins with experimental evidence. *Scientific Reports*. 2020;10(1):15109. doi:10.1038/s41598-020-71730-3.
47. Stober V. P., Lim Y. P., Opal S., Zhuo L., Kimata K., Garantziotis S. Inter- $\alpha$ -inhibitor Ameliorates Endothelial Inflammation in Sepsis. *Lung*. 2019;197(3):361-369. doi:10.1007/s00408-019-00228-1.
48. Laube N., Klein F., Bernsmann F. Kinetics of calcium oxalate crystal formation in urine. *Urolithiasis*. 2017;45(2):151-157. doi:10.1007/s00240-016-0900-y.

## РОЛЬ ИНГИБИТОРОВ ИММУННЫХ КОНТРОЛЬНЫХ ТОЧЕК В РЕАЛИЗАЦИИ ПРОТИВОРАКОВОГО ИММУНИТЕТА

Дмитриевская М. И.<sup>1</sup>, Ибрагимова Д. Н.<sup>1</sup>, Усеинова А. Н.<sup>1</sup>, Ребик А. А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Кафедра базисной и клинической фармакологии, <sup>2</sup>Центральная научно-исследовательская лаборатория, Медицинская академия имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского», 295051, бульвар Ленина 5/7, Симферополь, Россия

**Для корреспонденции:** Дмитриевская Мария Игоревна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры базисной и клинической фармакологии, Медицинская академия имени С. И. Георгиевского, ФГАОУ ВО «КФУ им. В. И. Вернадского», e-mail: m.dmitrievskaya@mail.ru

**For correspondence:** Dmitrievskaya Maria Igorevna, PhD? Associate Professor of the Department of Basic and Clinical Pharmacology, Medical Academy named after S.I. Georgievsky of Vernadsky CFU, e-mail: m.dmitrievskaya@mail.ru

### Information about authors:

**Dmitrievskaya M. I.**, <https://orcid.org/0000-0001-5722-1726>

**Ibragimova D. N.**, <https://orcid.org/0000-0002-5350-7409>

**Useinova A. N.**, <https://orcid.org/0000-0003-0725-5455>

**Rebik A. A.**, <https://orcid.org/0000-0001-5346-3998>

### РЕЗЮМЕ

Иммунотерапия в настоящее время становится эффективным направлением в борьбе с разнообразными формами злокачественных новообразований. Это связано с внедрением в клиническую практику ингибиторов иммунных контрольных точек, противоопухолевое действие которых связано с блокировкой сигнальных путей CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4), PD-1 (programmed cell death protein 1), PD-L1 (programmed cell death ligand 1).

Физиологическая роль иммунных точек заключается в предотвращении аутоиммунного повреждения тканей путём супрессии эффекторов. Однако раковые клетки адаптировались к использованию данного механизма во избежание элиминации с помощью механизмов ускользания от иммунологического надзора. Это дало толчок к разработке лекарственных средств, способных ингибировать контрольные точки, предоставляя возможность собственному иммунитету уничтожать опухолевые клетки.

На сегодняшний день зарегистрировано 7 препаратов, которые по механизму действия можно разделить на три группы: ингибиторы CTLA-4 (пилимумаб), PD-1 (ниволумаб, пембролизумаб, пролголимаб) и PD-L1 (атезолизумаб, авелумаб, дурвалумаб). Лекарственное средство первой группы тормозит клеточный ответ на этапе его активации. Механизм действия препаратов второй и третьей групп направлен на блокировку связывания рецептора PD-1 лимфоцитов и моноцитов с лигандами PD-L1 и наоборот.

Следует отметить, что использование ингибиторов иммунных контрольных точек может повлечь за собой возникновение нежелательных иммуноопосредованных реакций, характер и частота которых различаются в зависимости от класса ингибиторов. В связи с этим своевременная диагностика и лечение осложнений являются залогом успеха противоопухолевой терапии.

**Ключевые слова:** противоопухолевая терапия, иммунные контрольные точки, ингибиторы иммунных контрольных точек, CTLA-4, PD-1, PD-L1.

### THE ROLE OF IMMUNE CHECKPOINT INHIBITORS IN ANTITUMORAL IMMUNITY

Dmitrievskaya M. I., Ibragimova D. N., Useinova A. N., Rebik A. A.

Medical Academy named after S. I. Georgievsky of Vernadsky CFU, Simferopol, Russia

### SUMMARY

Currently immunotherapy is becoming a fairly effective approach in the fight against various forms of malignant neoplasms. This is due to the discovery and use in clinical practice immune checkpoint inhibitors, which antitumoral effect is associated with blockage the signaling pathways CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4), PD-1 (programmed cell death protein 1), PD-L1 (programmed cell death ligand 1).

The physiological role of immune points is to prevent autoimmune tissue damage by suppressing effectors. However, cancer cells have adapted for using this mechanism to avoid elimination by escape mechanisms from immunological surveillance. This gave impetus to the development of drugs that can inhibit checkpoints, enabling the immune system to destroy tumor cells. Actually, 7 drugs have been registered, which can be divided into three groups according to the mechanism of action: CTLA-4 (pilimumab), PD-1 (nivolumab, pembrolizumab, prolgolimab) and PD-L1 (atezolizumab, avelumab, durvalumab) inhibitors. The medicine of the first group inhibits the cellular response at the stage of its activation. The mechanism of action of the second and third groups medicines is aimed at blocking the binding of the PD-1 receptor of lymphocytes and monocytes with PD-L1 ligands and vice versa.

The use of immune checkpoint inhibitors can lead to the occurrence of immune-mediated adverse reactions, the

nature and frequency of which differ depending on the class of inhibitors. In this regard, timely diagnosis and treatment of complications is the key to the success of anticancer therapy.

**Key words:** antitumor therapy, immune checkpoints, immune checkpoint inhibitors, CTLA-4, PD-1, PD-L1.

В настоящее время онкопатология является одной из ведущих причин смертности в мире, и в ближайшие 10 лет ожидается увеличение количества летальных случаев. Этот факт определяет актуальность изучения и внедрения инновационных подходов к лечению данной группы заболеваний. Вместе с традиционными методами, направленными на эрадикацию делящихся опухолевых клеток, вошла в практику иммунотерапия злокачественных новообразований, которая повышает естественную защиту организма от опухолевых клеток. Новое направление представляет собой применение лекарственных препаратов биологического происхождения или синтетических аналогов для активации иммунной системы с целью распознавания и элиминации опухолевых клеток [1]. В отличие от классического химиотерапевтического подхода к лечению, результаты иммунотерапии демонстрируют продолжительную ремиссию, причем иногда даже при далеко зашедших стадиях онкологических заболеваний.

Противораковый статус зависит от реактивности организма: как недостаточный, так и чрезмерный иммунные ответы оказывают неблагоприятное воздействие. Первый обеспечивает условия для развития опухолей, второй – для аутоиммунных заболеваний [2].

Взаимодействие иммунной системы с раковыми клетками начинается с поглощения антигенпрезентирующей клеткой (АПК) опухолевого антигена, его процессинга и презентации в виде пептидов в комплексе с молекулами главного комплекса гистосовместимости (Major histocompatibility complex, МНС) II класса наивным Т-лимфоцитам. В результате происходит их дифференцировка в эффекторы и клетки иммунологической памяти, но для полной активации Т-киллеров этого недостаточно, необходим также баланс между костимулирующими и коингибирующими сигналами (Рис.1). Рецепторы и лиганды, принимающие участие в реализации этих сигналов, называются иммунными контрольными точками (ИКТ) [3].

Внедрение ингибиторов ИКТ в противоопухолевую терапию значительно улучшило прогнозы относительно 5-летней выживаемости у больных с различными формами злокачественных новообразований [4]. Спектр показаний к применению указанных препаратов с каждым годом расширяется, но вместе с тем появляются сведения о возникновении побочных эффектов вследствие активации иммунной системы.

Целью данной работы является обзор механизмов действия ингибиторов ИКТ, а также анализ последствий их применения.

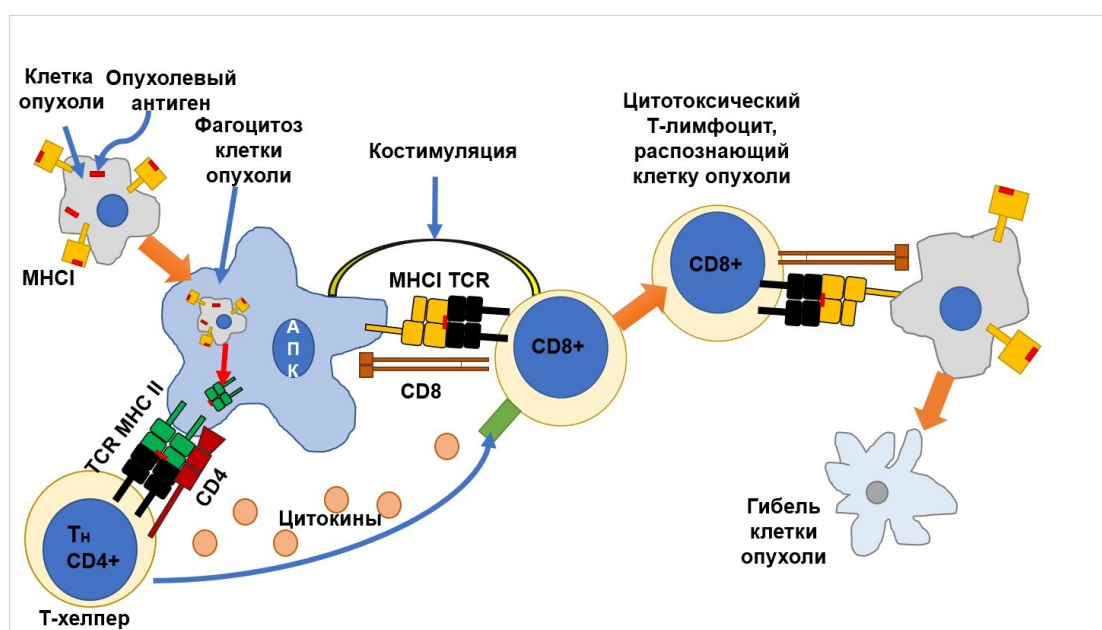


Рис. 1. Взаимодействие иммунной системы с раковыми клетками.

Наиболее изученные и значимые механизмы действия ингибиторов ИКТ в противоопухолевой терапии реализуются за счёт воздействия на рецепторы CTLA-4 и PD-1.

CTLA-4 регулирует активацию недифференцированных Т-клеток путём конкуренции с рецептором CD28 за связывание с лигандом B7 (CD80 и CD86), который экспрессируется АПК. В отличие от CD28, стимулирующего Т-лимфоциты, CTLA-4 блокирует передачу сигналов через Т-клеточный рецептор (TCR). CTLA-4 обладает более высоким, по сравнению с CD28, сродством к B7, что говорит о преобладании сигналов ингибирования при инициации иммунного ответа. Для активации Т-клеток необходимо связывание B7 с CD28, обеспечивающее положительные стимулирующие сигналы. Следовательно, конкурентное ингибирование вышеуказанного взаимодействия с помощью CTLA-4 снижает уровень активации Т-лимфоцитов [5; 6].

Белок PD-1 экспрессируется на поверхности уже активированных Т-лимфоцитов и осуществляет регуляцию иммунного ответа на эффекторной стадии. Имеет лиганды PD-L1 и PD-L2 (programmed cell death ligand 2), которые могут локализоваться как на поверхности АПК, так и на опухолевых клетках. Индукция экспрессии PD-L1 происходит в результате воздействия интерферонов I и II типов, JAK2 (Янус-киназа 2) - ассоциированных цитокинов и лигандов [7]. PD-1, связываясь на внутриклеточном уровне с лигандом, инактивирует сигнальный путь TCR, что приводит к уменьшению высвобождения цитокинов, включая интерферон- $\gamma$  и интерлейкин-2, снижению активности Т-клеток и их самоуничтожению. Таким образом, роль вышеописанных сигнальных путей заключается в предупреждении слишком сильного иммунного ответа в лимфоидных тканях в местах активации иммунного ответа (CTLA-4) и в тканях на периферии (PD-1) [8; 9].

Однако, выживающие после действия иммунной системы опухолевые клетки приспособились к уклонению от надзора с помощью различных механизмов. Один из них реализуется путём подавления образования опухолевых антигенов. Второй направлен на подавление активности Т-лимфоцитов опухолевыми клетками. Как раз, одна из разновидностей второго механизма предполагает воздействие злокачественных клеток на ИКТ с подавлением функции Т-киллеров [10; 11]. Поэтому внедрение препаратов, блокирующих иммунотолерантность опухолевых клеток, приводит к их уничтожению.

Классификация ингибиторов контрольных точек основана на механизме действия препа-

ратов, согласно которому их подразделяют на три группы: ингибиторы CTLA-4 (ипилимумаб); ингибиторы PD-1 (пембролизумаб, ниволумаб, пролголимаб); ингибиторы PD-L1 (авелумаб, атезолизумаб, дурвалумаб).

Первым иммунотерапевтическим препаратом, который был одобрен в 2011 году Управлением по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств США (FDA) и Европейским агентством по лекарственным средствам (EMA) для лечения метастатической меланомы, стал ипилимумаб. Он представляет собой полностью гуманизированный иммуноглобулин (Ig) класса G1 к CTLA-4 [1]. Назначают препарат в дозе 3 мг/кг раз в три недели в четыре введения. Ипилимумаб – один из немногих препаратов, при применении которого удается добиться выраженного эффекта. Следует отметить, что повторное прибегание к такой терапии у больных, ранее ответивших на лечение, эффективнее, чем первое [12].

В связи с тем, что иммунотерапия ингибиторами CTLA-4 сопровождается увеличением размеров опухолевых очагов, обусловленных инфильтрацией иммунными клетками, а не прогрессированием опухоли, были предложены новые критерии оценки эффективности иммунологических препаратов. Дифференцировка истинного и ложного прогрессирования новообразований возможна при динамическом наблюдении пациента, проведении повторных исследований спустя месяц после лечения и оценке его общего состояния [13].

Применение ипилимумаба в клинических исследованиях 2-3 фазы продемонстрировало возможность существенного увеличения общей выживаемости отдельных пациентов – примерно 20 % имеют шансы прожить более 3 лет, у некоторых продолжительность жизни увеличивается до 10 лет [14].

Ингибиторы PD-1 и PD-L1 были зарегистрированы в США в 2014–2017 годах. Ниволумаб – первый иммуноонкологический препарат, доказавший эффективность и зарегистрированный в России для лечения сразу 3 видов опухолей. Он представляет собой человеческое моноклональное антитело класса G4, блокирующее взаимодействие между белком запрограммированной клеточной гибели 1 и его лигандами. В исследованиях по трём зарегистрированным показаниям (немелкоклеточный рак лёгкого (НМРЛ), почечно-клеточный рак, метастатическая или неоперабельная меланома) препарат показал более высокую эффективность по сравнению с классической терапией, как в рамках многочисленных клинических исследований, так и в масштабной программе расширенного доступа [1].

Пембролизумаб – это человеческий моноклональный IgG4 к PD-1, который был одобрен в 2014 году для лечения прогрессирующей меланомы. В 2016-2017 годах его стали применять для лечения НМРЛ, рака головы и шеи, уротелиальной карциномы [15]. В 2016 году пембролизумаб зарегистрирован в России для лечения пациентов с неоперабельной или метастатической меланомой и НМРЛ, у которых подтверждена экспрессия PD-L1 раковыми клетками и наблюдается прогрессирование заболевания во время или после терапии препаратами платины [16].

Пролголимаб (Фортека) — первый российский ингибитор PD-1, представляющий собой моноклональное антитело изотипа IgG1 с Fc-фрагментом, модифицированным методом генной инженерии. В апреле 2020 года препарат был одобрен Министерством здравоохранения России для терапии одного из наиболее агрессивных видов рака — метастатической или неоперабельной меланомы [17]. В июле 2020 года препарат вышел на российский рынок и стал доступен для пациентов. С 2021 года включен в перечень жизненно важных и необходимых лекарственных препаратов. Пролголимаб доказал свою эффективность в монотерапии метастатической меланомы и подтвердил благоприятный профиль безопасности. В настоящее время препарат исследуется для терапии таких заболеваний, как рак шейки матки, рак легкого и другие злокачественные новообразования. Пролголимаб вошёл в Клинические рекомендации «Меланома кожи и слизистых оболочек», в стандарт специализированной медицинской помощи при меланоме Министерства Здравоохранения РФ [18; 19].

В 2016 году FDA было одобрено применение еще трех новых ингибиторов ИКТ. Все препараты – моноклональные IgG1 к PD-L1, селективно блокирующие взаимодействие PD-L1 с PD-1, при этом не затрагивая взаимодействие между PD-1 и PD-L2 [20]. Атезолизумаб был зарегистрирован в России для лечения НМРЛ и уротелиального рака. Исследования показали, что его использование в отношении НМРЛ более фармакоэкономически целесообразно, чем применение вышеописанных препаратов второй группы. Рекомендованная доза составляет 1200 мг в виде внутривенной инфузии каждые 3 недели. Дурвалумаб – ещё одно средство третьей группы ингибиторов ИКТ, показаниями к применению которого являются уротелиальная карцинома и НМРЛ [1]. Применяют препарат внутривенно, режим дозирования устанавливается индивидуально, с учетом переносимости и безопасности средства. Авелумаб применяют в противоопухолевой терапии карциномы Меркеля и уротели-

альной карциномы. Следует учитывать, что спектр показаний к применению ингибиторов ИКТ расширяется по мере изучения препаратов [1]. Применение авелумаба следует продолжать в соответствии с рекомендуемой схемой до тех пор, пока наблюдается эффект или не возникнут неприемлемые токсические проявления.

Несмотря на то, что ингибиторы ИКТ обладают достаточно высокой клинической эффективностью, их применение может повлечь нарушения в работе различных органов и систем на разных стадиях лечения: от начальных этапов вплоть до периода после прекращения терапии. Частота развития иммуноопосредованных побочных эффектов выше при использовании препаратов, блокирующих CTLA-4 по сравнению с ингибиторами PD-1/PD-L1 [21]. Так, при лечении ингибиторами CTLA-4 чаще наблюдаются кожные реакции (зуд, сыпь), поражения эндокринной системы (гипофизит), желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) (диарея, колит). Терапия препаратами, блокирующими PD-1, характеризуется нарушениями со стороны дыхательной системы (пневмонит), реже – ЖКТ, кожи и эндокринных желез. Блокаторы PD-L1 вызывают развитие пневмонита. У пациентов, получающих терапию ингибиторами ИКТ, может развиваться состояние, известное как синдром высвобождения цитокинов, которое, помимо других симптомов, может сопровождаться лихорадкой, тахикардией, снижением артериального давления и др. Синдром вызван большим и быстрым высвобождением цитокинов в кровь из иммунных клеток, на которые воздействует иммунотерапия. Синдром высвобождения цитокинов обычно развивается в течение нескольких часов или дней после инфузии; у большинства пациентов возможна незначительная реакция на инфузию, но у некоторых – более тяжелая: пациенты могут испытывать неврологические симптомы, такие как спутанность сознания, тремор. Для устранения тяжёлых иммуноопосредованных явлений применяют глюкокортикоиды, при более лёгком течении прибегают к симптоматическому лечению; в зависимости от течения основного и сопутствующих заболеваний консилиум специалистов принимает решение о продолжении или прекращении иммунотерапии.

Следует отметить, что время появления побочных эффектов, связанных с иммунотерапией, менее предсказуемо, чем при использовании других видов лечения рака. У пациентов, получающих иммунотерапию, могут развиваться побочные эффекты вскоре после приема первой дозы лекарства или спустя долгое время после окончания курса лечения. При иммунотерапии, даже после однократной инъекции, возможно



развитие неожиданных осложнений, таких как сахарный диабет I типа, риск развития туберкулеза и т.п., поэтому пациенты, получающие ингибиторы контрольных точек, должны находиться под пристальным наблюдением, чтобы на ранней стадии можно было диагностировать и лечить потенциально опасные для жизни осложнения.

Понимание патогенеза и клинической картины нежелательных реакций не только поможет клиницистам управлять этими событиями более эффективно, но и позволит прогнозировать безопасность возобновления лечения после их разрешения. Необходимо принимать во внимание неоднородную клиническую картину пациентов с побочными проявлениями и широкий спектр пораженных органов, что свидетельствует о том, что ведение пациентов с побочными реакциями часто выходит за рамки онкологии и требует междисциплинарного подхода [22].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение ингибиторов ИКТ становится актуальным направлением противоопухолевой терапии. Несмотря на то, что исследования находятся лишь в начале пути, уже стало понятно, что контрольные точки, точнее их угнетение, оказывают влияние на активацию противоракового иммунитета. В связи с риском развития осложнений иммунотерапии своевременная диагностика и лечение нарушений являются залогом успеха лечения злокачественных новообразований.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке в рамках государственного задания № FZEG-2020-0060 Минобрнауки России в сфере научной деятельности темы «Алгоритмы молекулярно-генетической диагностики злокачественных новообразований и подходы к их таргетной терапии с применением клеточных и генетических технологий».

**Funding.** This work was financially supported by state task No FZEG-2020-0060 of the Russian Ministry of Science in the field of scientific research on the topic «Algorithms for molecular-genetic diagnosis of malignant neoplasms and approaches to their targeted therapy using cellular and genetic technologies».

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors have no conflict of interests to declare.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Шубникова Е. В., Букатина Т. М., Вельц Н. Ю., Каперко Д. А., Кутехова Г. В. Ингибиторы контрольных точек иммунного ответа: новые риски нового класса

противоопухолевых средств. Безопасность и риск фармакотерапии. 2020;8(1):9-22. doi:10.30895/2312-7821-2020-8-1-9-22.

2. Насонов Е. Л. Ингибция иммунных контрольных точек и аутоиммунитет: ревматологические проблемы. Научно-практическая ревматология. 2018;56(1):5–9. doi:10.14412/1995-4484-2018-5-9.

3. Thommen D.S., Schumacher T.N. T cell dysfunction in cancer. *Cancer Cell*. 2018;33(4):547-562. doi:10.1016/j.ccell.2018.03.012.

4. Волков Н. М. Иммуноterapia. Практическая онкология. 2018;19(3):226-235. doi:10.31917/1903226.

5. Sakamuri D., Glitza I.C., Betancourt Cuellar S.L., Subbiah V., Fu S., Tsimberidou A.M., et al. Phase I dose-escalation study of anti-CTLA-4 antibody ipilimumab and lenalidomide in patients with advanced cancers. *Mol Cancer Ther*. 2018;17(3):671-676. doi:10.1158/1535-7163.

6. Simmons D., Lang E. The most recent oncologic emergency: what emergency physicians need to know about the potential complications of immune checkpoint inhibitors. *Cureus*. 2017;9(10):e1774. doi:10.7759/cureus.1774.

7. Лепик К. В. Ингибиторы иммунных контрольных точек в терапии лимфом. Клиническая онкогематология. 2018;11(4):303-312. doi:10.21320/2500-2139-2018-11-4-303-312.

8. Саяпина М. С. Иммунорегуляторные функции ингибиторов PD-1/PD-L1 и развитие к ним резистентности. Злокачественные опухоли. 2017;(2):94-99. doi:10.18027/2224-5057-2017-2-94-99.

9. Bousiotis V.A. Molecular and biochemical aspects of the PD-1 checkpoint pathway. *N Engl J Med*. 2016;375(18):1767-1778. doi:10.1056/NEJMr1514296.

10. Болотина Л. В., Каприн А. Д. Иммуноонкология: новые возможности лекарственной терапии солидных опухолей. Онкология. Журнал им. П.А. Герцена. 2017;6(5):74-80. doi:10.17116/onkolog20176574-80.

11. Южакова Д. В., Ширманова М. В., Сергеева Т. Ф., Загайнова Е.В., Лукьянов К.А. Иммуноterapia злокачественных новообразований. Современные технологии в медицине. 2016;8(1):173-182. doi:10.17691/stm2016.8.1.23.

12. Новик А. В. Современная иммунотерапия меланомы кожи. Эффективная фармакотерапия. 2017;(1):26-31.

13. Юдин Д. И., Лактионов К. К., Саранцева К. А., Бредер В. В., Реутова Е. В., Борисова О. И. Ардзинба. Псевдопрогрессирование на фоне иммунотерапии. Медицинский совет. 2019;(10):10-14. doi:10.21518/2079-701X-2019-10-10-14

14. Schadendorf D., Hodi F.S., Robert C., Weber J.S., Margolin K., Hamid O., et al. Pooled Analysis of Long-Term Survival Data From Phase II and Phase III Trials of Ipilimumab in Unresectable or Metastatic Melanoma. *J Clin Oncol*. 2016;33(17):1889-1894. doi:10.1200/JCO.2014.56.2736

15. Robert C., Schachter J., Long G.V., Arance A., Grob J.J., Mortier L., et al. Pembrolizumab versus ipilimumab in advanced melanoma. *New Engl J Med.* 2015;372(26):2521-2532. doi:10.1056/NEJMoa1503093.
16. Румянцев А. Г., Тюляндин С. А. Эффективность ингибиторов контрольных точек иммунного ответа в лечении солидных опухолей. *Практическая онкология.* 2016;17(2):74-89.
17. Жукова Н.В., Орлова Р.В., Каледина Е.А. и др. Иммуноterapia метастатической меланомы вчера, сегодня, завтра. Эффективная фармакотерапия. 2021;17(11):22–28. doi:10.33978/2307-3586-2021-17-11-22-28.
18. Клинические рекомендации Министерства здравоохранения РФ “Меланома кожи и слизистых оболочек”, 2020. Доступно по: [https://melanomapro.ru/uploads/docs/CR\\_melanoma\\_2020\\_final\\_compressed.pdf](https://melanomapro.ru/uploads/docs/CR_melanoma_2020_final_compressed.pdf). Ссылка активна на 24.06.2021.
19. Строяковский Д.Л., Абрамов М.Е., Демидов Л.В. и др. Практические рекомендации по лекарственному лечению меланомы кожи. Злокачественные опухоли: Практические рекомендации Российского общества клинической онкологии. 2020;10(3s2):266-281. doi:10.18027/2224-5057-2020-10-3s2-16.
20. Mann J.E. Atezolizumab (Tecentriq®). *Oncology Times.* 2017;39(4):31. doi:10.1097/01.cot.0000513325.52233.f1
21. Baxi S., Yang A., Gennarelli R.L., Khan N., Wang Z., Boyce L., Korenstein D. Immune-related adverse events for anti-PD-1 and anti-PD-L1 drugs: systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 2018;(360):k793. doi:10.1136/bmj.k793.
22. Martins F., Sofiya L., Sykiotis G.P., Lamine F., Maillard M., Fraga M., Shabafrouz K., Ribi C., Cairoli A., Guex-Crosier Y., Kuntzer T., Michielin O., Peters S., Coukos G., Spertini F., Thompson J.A., Obeid M. Adverse effects of immune-checkpoint inhibitors: epidemiology, management and surveillance. *Nat Rev Clin Oncol.* 2019;16(9):563-580. doi:10.1038/s41571-019-0218-0.
- REFERENCES**
1. Shubnikova E. V., Bukatina T. M., Velts N. Yu., Kaperko D. A., Kutekhova G. V. Immune Checkpoint Inhibitors: New Risks of a New Class of Antitumour Agents. *Safety and Risk of Pharmacotherapy.* 2020;8(1):9-22. (In Russ.). doi:10.30895/2312-7821-2020-8-1-9-22.
2. Nasonov E.L. Immune checkpoint inhibition and autoimmunity: rheumatological problems. *Rheumatology Science and Practice.* 2018;56(1):5-9. (In Russ.). doi:10.14412/1995-4484-2018-5-9.
3. Thommen D.S., Schumacher T.N. T cell dysfunction in cancer. *Cancer Cell.* 2018;33(4):547-562. doi:10.1016/j.ccell.2018.03.012.
4. Volkov N.M. Immunotherapy. *Practical oncology.* 2018;19(3):226-235. (In Russ.). doi:10.31917/1903226.
5. Sakamuri D., Glitza I.C., Betancourt Cuellar S.L., Subbiah V., Fu S., Tsimberidou M., et al. Phase I dose-escalation study of anti-CTLA-4 antibody ipilimumab and lenalidomide in patients with advanced cancers. *Mol Cancer Ther.* 2018;17(3):671-676. doi:10.1158/1535-7163.
6. Simmons D., Lang E. The most recent oncologic emergency: what emergency physicians need to know about the potential complications of immune checkpoint inhibitors. *Cureus.* 2017;9(10): e1774. doi:10.7759/cureus.1774.
7. Lepik K. V. Immune Checkpoint Inhibitors in the Treatment of Lymphomas. *Clinical oncohematology.* 2018;11(4):303-312. (In Russ.). doi:10.21320/2500-2139-2018-11-4-303-312.
8. Sayapina M. S. Immunoregulatory functions of PD-1/PD-L1 inhibitors and development of resistance to them. *Malignant tumours.* 2017;(2):94-99. (In Russ.). doi:10.18027/2224-5057-2017-2-94-99
9. Bousiotis V.A. Molecular and biochemical aspects of the PD-1 checkpoint pathway. *N Engl J Med.* 2016;375(18):1767-1778. doi:10.1056/NEJMra1514296.
10. Bolotina L. V., Kaprin A. D. Immuno-oncology: new possibilities of drug therapy for solid tumors. *P. A. Herzen Journal of Oncology.* 2017;6(5):74-80. (In Russ.). doi:10.17116/onkolog20176574-80.
11. Yuzhakova D. V., Shirmanova M. V., Sergeeva T.F., Zagaynova E.V., Lukyanov K.A. Immunotherapy of cancer (review). *Modern Technologies in Medicine.* 2016;8(1):173-182. (In Russ.). doi:10.17691/stm2016.8.1.23.
12. Novik A. V. Modern Immunotherapy of Skin Melanoma. *Effectivnaya farmakoterapiya.* 2017;(1):26-31. (In Russ.).
13. Yudin D. I., Laktionov K. K., Sarantseva K. A., Breder V. V., Reutova E. V., Borisova O. I., Ardzinba M. S. Pseudoprogression in patients on immunotherapy. *Meditsinsky Sovet.* 2019;(10):10-14. (In Russ.). doi:10.21518/2079-701X-2019-10-10-14.
14. Schadendorf D., Hodi F.S., Robert C., Weber J.S., Margolin K., Hamid O., et al. Pooled Analysis of Long-Term Survival Data From Phase II and Phase III Trials of Ipilimumab in Unresectable or Metastatic Melanoma. *J Clin Oncol.* 2016;33(17):1889-1894. doi:10.1200/JCO.2014.56.2736.
15. Robert C., Schachter J., Long G.V., Arance A., Grob J.J., Mortier L., et al. Pembrolizumab versus ipilimumab in advanced melanoma. *New Engl J Med.* 2015;372(26):2521-2532. doi:10.1056/NEJMoa1503093.
16. Rumyantsev A. A., Tjulandin S.A. Efficiency of immune checkpoints inhibitors in the treatment of solid tumors. *Practical Oncology.* 2016;17(2):74-89. (In Russ.).
17. Zhukova N.V., Orlova R.V., Kaledina E.A. et al. Immunotherapy of metastatic melanoma yesterday, today, tomorrow. *Effective pharmacotherapy.* 2021;17(11):22–28. doi:10.33978/2307-3586-2021-17-11-22-28.
18. Clinical guidelines of the Ministry of Health of the Russian Federation «Melanoma of the skin and mucous membranes», 2020. Available at: <https://melanomapro.ru/>

uploads/docs/CR\_melanoma\_2020\_final\_compressed.pdf. Link is active on 24.06.2021.

19. Stroyakovskiy D.L., Abramov M.E., Demidov L.V. Practical recommendations for drug treatment of skin melanoma. *Malignant Tumors: Practical Recommendations of the Russian Society of Clinical Oncology*. 2020;10(3s2):266-281. doi:10.18027/2224-5057-2020-10-3s2-16.

20. Mann J.E. Atezolizumab (Tecentriq®). *Oncology Times*. 2017;39(4):31. doi:10.1097/01.cot.0000513325.52233.f1.

21. Baxi S., Yang A., Gennarelli R.L., Khan N., Wang Z., Boyce L., Korenstein D. Immune-related adverse events for anti-PD-1 and anti-PD-L1 drugs: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2018;(360):k793. doi:10.1136/bmj.k793.

22. Martins F., Sofiya L., Sykiotis G.P., Lamine F., Maillard M., Fraga M., Shabafrouz K., Ribic C., Cairoli A., Gueix-Crosier Y., Kuntzer T., Michielin O., Peters S., Coukos G., Spertini F., Thompson J.A., Obeid M. Adverse effects of immune-checkpoint inhibitors: epidemiology, management and surveillance. *Nat Rev Clin Oncol*. 2019;16(9):563-580. doi:10.1038/s41571-019-0218-0.