

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«КРЫМСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ В. И. ВЕРНАДСКОГО»  
ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ МЕДИЦИНСКИЙ ИНСТИТУТ  
ИМЕНИ С. И. ГЕОРГИЕВСКОГО

# КРЫМСКИЙ ЖУРНАЛ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ И КЛИНИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ

CRIMEAN JOURNAL OF EXPERIMENTAL AND CLINICAL MEDICINE

2024, том 14, № 2

## 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

*Ю. В. Бобрик* (Симферополь, Россия), *Л. ДуБаске* (Вашингтон, США),  
*В. П. Завьялов* (Турку, Финляндия), *А. В. Матвеев* (Москва, Россия),  
*О. Матсуо* (Осакасама, Япония), *В. Ю. Михайличенко* (Симферополь, Россия),  
*В. В. Оберемок* (Симферополь, Россия), *С. Н. Орлов* (Монреаль, Канада),  
*В. Б. Павленко* (Симферополь, Россия), *А. В. Петров* (Симферополь, Россия),  
*А. Петросян* (Оаха, США), *М. Покорский* (Ополе, Польша), *А. Г. Резников* (Киев, Украина),  
*И. Д. Сапегин* (Симферополь, Россия), *Т. П. Сатаева* (Симферополь, Россия),  
*Г. М. Тарман* (Инсбрук, Австрия), *А. В. Ушаков* (Симферополь, Россия),  
*С. Э. Шибанов* (Симферополь, Россия)

На первой странице обложки репродукция картины Роберта Тома «Андреас Везалий – основоположник научной анатомии». Андреас Везалий будучи профессором хирургии и анатомии в Падуанском университете в 1537–1543 годах (Бельгия), провел множество анатомических демонстраций на человеческих телах. Его главный научный труд «De humani corporis fabrica libri septem» («О строении человеческого тела») является классикой медицинской литературы.

## АДРЕС РЕДАКЦИИ:

295051, Республика Крым, г.Симферополь, бульвар Ленина 5/7  
ФГАОУ ВО «КФУ имени В. И. Вернадского», Ордена Трудового Красного Знамени Медицинский институт  
имени С. И. Георгиевского  
E-mail: cjecm\_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), 2224-6452 (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 01.02.2022 г. №33-р о перечне рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук (далее - Перечень) и вступлением в силу новой редакции номенклатуры научных специальностей, по которым присуждаются ученые степени, утвержденной приказом Минобрнауки России от 24.02.2021 №118, с изменениями, внесенными приказом Минобрнауки России от 27.09.2021 №886, журнал считается включенным в Перечень по следующим научным специальностям и соответствующим им отраслям наук:

- 1.5.4. Биохимия (медицинские науки),
- 1.5.5. Физиология человека и животных (медицинские науки),
- 1.5.22. Клеточная биология (медицинские науки);
- 3.1.33. Восстановительная медицина, спортивная медицина, лечебная физкультура, курортология и физиотерапия (медицинские науки);
- 3.3.1. Анатомия человека (медицинские науки);
- 3.3.2. Патологическая анатомия (медицинские науки);
- 3.3.3. Патологическая физиология (медицинские науки);
- 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология (медицинские науки);
- 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика (медицинские науки).

Подписной индекс издания в каталоге Агентства «Роспечать» — 80124  
Рекомендован к печати Ученым советом  
Ордена Трудового Красного Знамени Медицинского института имени С. И. Георгиевского  
(протокол № 5 от 30.05.2024)

УЧРЕДИТЕЛЬ И ИЗДАТЕЛЬ:  
ФГАОУ ВО «КРЫМСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ В.И.ВЕРНАДСКОГО  
295007, Республика Крым, г.Симферополь, пр-т Академика Вернадского, 4

*Журнал основан в 2010 году. Издается 4 раза в год.*

© Ордена Трудового Красного Знамени Медицинский институт имени С. И. Георгиевского, ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», 2024

## СОДЕРЖАНИЕ

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

## ORIGINAL ARTICLES

<b>Бяловский Ю. Ю., Ракитина И. С., Абаленихина Ю. В., Щулькин А. В.</b> ВОСПАЛЕНИЕ И ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС В УСЛОВИЯХ ДОПОЛНИТЕЛЬНОГО РЕСПИРАТОРНОГО СОПРОТИВЛЕНИЯ .....	5
<b>Byalovsky Yu. Yu., Rakitina I. S., Abalenikhina Yu. V., Shchulkin A. V.</b> INFLAMMATION AND OXIDATIVE STRESS UNDER ADDITIONAL RESPIRATORY RESISTANCE .....	5
<b>Волоцкая Н. И., Голубинская Е. П., Зяблицкая Е. Ю., Марулова А. В.</b> МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ВЕРИФИКАЦИЯ ХРОНИЧЕСКОГО ЭНДОМЕТРИТА ПРИ ГИПЕРПЛАЗИИ ЭНДОМЕТРИЯ .....	14
<b>Volotskaya N. I., Golubinskaya E. P., Ziablitskaia E. Y., Marulova A. V.</b> MORPHOLOGICAL VERIFICATION OF CHRONIC ENDOMETRITIS IN ENDOMETRIAL HYPERPLASIA .....	14
<b>Воробьев Н. В., Кульченко Н. Г., Толкачев А. О., Попов С. В., Салюков Р. В., Мяндина Г. И., Миронцев А. В., Ростовская В. В., Джандарова Т. И.</b> ОСЛОЖНЕНИЯ ХИРУРГИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ БОЛЬНЫХ ПОЧЕЧНО-КЛЕТОЧНЫМ РАКОМ .....	21
<b>Vorobyev N. V., Kulchenko N. G., Tolkachev A. O., Popov S. V., Salyukov R. V., Myandina G. I., Mirontsev A. V., Rostovskaya V. V., Dzhandarova T. I.</b> COMPLICATIONS OF SURGICAL TREATMENT OF PATIENTS WITH RENAL CELL CARCINOMA .....	21
<b>Паршенков М. А., Корякин С. Н., Урусханова Ж. Э., Петрусевич Д. А., Сковородко П. П., Анурова М. Н., Родионова Г. М., Миронцев А. В., Ростовская В. В., Джандарова Т. И., Демяшкин Г. А.</b> РОЛЬ ЦИТОКИНОВ И АПОПТОЗА ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ В МОДЕЛИ ОСТРОЙ ЛУЧЕВОЙ НЕФРОПАТИИ .....	26
<b>Parshenkov M. A., Koryakin S. N., Urus Khanova Z. E., Petrusevich D. A., Skovorodko P. P., Anurova M. N., Rodionova G. M., Mirontsev A. V., Rostovskaya V. V., Dzhandarova T. I., Demyashkin G. A.</b> THE ROLE OF CYTOKINES AND APOPTOSIS AFTER ASCORBIC ACID INTRODUCING IN A MODEL OF ACUTE RADIATION NEPHROPATHY .....	26
<b>Коханов А. В., Бисалиева Р. А., Эбзеева Л. Х.</b> ФЕТАЛЬНЫЙ ГЕМОГЛОБИН И НЕЙРОГЛОБИН В КРОВИ ПАЦИЕНТОВ ПОСЛЕ РЕКОНСТРУКТИВНЫХ ОПЕРАЦИЙ НА СОННЫХ АРТЕРИЯХ .....	39
<b>Kokhanov A. V., Bisaliev R. A., Ebzeeva L. Kh.</b> FETAL HEMOGLOBIN AND NEUROGLOBIN IN THE BLOOD OF PATIENTS AFTER RECONSTRUCTIVE SURGERY ON THE CAROTID ARTERIES .....	39
<b>Пугачева Е. Н., Вадюхин М. А., Мургазалиева З. М., Игнатко И. В.</b> ОСОБЕННОСТИ ПРОЛИФЕРАЦИИ И АПОПТОЗА Фолликулярных Клеток При Введении АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ В МОДЕЛИ РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННОЙ ОВАРИАЛЬНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ .....	47

**Pugacheva E. N., Vadyukhin M. A., Murtazalieva Z. M., Ignatko I. V.**

FEATURES OF FOLLICULAR CELL PROLIFERATION AND APOPTOSIS WITH ASCORBIC ACID  
INTRODUCING IN A MODEL OF RADIATION-INDUCED OVARIAL INSUFFICIENCY.....47

**Щекин В. И.**

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ТУЧНЫХ КЛЕТОК В СЕМИНОМЕ .....52

**Shchekin V. I.**

QUANTITATIVE CHARACTERISTICS OF MAST CELLS IN SEMINOMA.....52

**ОБЗОРЫ**

**REVIEWS**

**Волошин И. А., Гаджихмедова А. Н., Жариков Ю. О.**

АКТИВНАЯ КЛЕТОЧНАЯ МАССА И ЕЕ ЗНАЧЕНИЕ ДЛЯ ПРОГНОЗА ЦИРРОЗА ПЕЧЕНИ .....58

**Voloshin I. A., Gadziakhmedova A. N., Zharikov Yu. O.**

ACTIVE CELL MASS AND ITS VALUE IN PROGNOSIS OF LIVER CIRRHOSIS.....58

УДК 612.281

DOI: 10.29039/2224-6444-2024-14-2-5-13

## ВОСПАЛЕНИЕ И ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС В УСЛОВИЯХ ДОПОЛНИТЕЛЬНОГО РЕСПИРАТОРНОГО СОПРОТИВЛЕНИЯ

Бяловский Ю. Ю., Ракитина И. С., Абаленихина Ю. В., Щулькин А. В.

Федеральное государственное образовательное учреждение высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П.Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России), 390000, Россия, г. Рязань, ул. Полонского, д. 13

**Для корреспонденции:** Бяловский Юрий Юльевич, доктор медицинских наук, профессор, зав. кафедрой патофизиологии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, e-mail: b\_uu@mail.ru

**For correspondence:** Yury. Yu. Byalovsky, Prof., MD, Head of the Department of Pathophysiology, Ryazan State Medical University, e-mail: b\_uu@mail.ru

### Information about authors:

**Byalovsky Yu. Yu.**, <https://orcid.org/0000-0002-6769-8277>

**Rakitina I. S.**, <https://orcid.org/0000-0002-9406-1765>

**Abalenikhina Yu. V.**, <https://orcid.org/0000-0003-0427-0967>

**Shchulkin A. V.**, <https://orcid.org/0000-0002-5618-7607>

### РЕЗЮМЕ

Резистивное дыхание с дополнительным респираторным сопротивлением (ДРС) требует увеличения мощности работы дыхательных мышц. Имеются убедительные доказательства того, что патофизиологические изменения в условиях ДРС связаны с генерацией воспалительных процессов и запуском механизмов окислительного стресса. Целью исследования было изучение формирования окислительных и воспалительных процессов в условиях разной величины дополнительного респираторного сопротивления. Материал и методы. В исследовании участвовали 24 человека, которые осуществляли резистивное дыхание либо без сопротивления (контроль), либо с резистивными нагрузками, эквивалентными 40 и 60% от P<sub>тmax</sub> в течение 20 минут. В лейкоцитарном лизате определяли провоспалительные цитокины TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , относительные изменения уровня карбонильных производных белков, белковые SH-группы, активность супероксиддисмутазы (СОД), глутатион-пероксидазы. Результаты. 20-минутное резистивное дыхание с ДРС 40 и 60% P<sub>тmax</sub> повышало относительное количество провоспалительных цитокинов TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ . Ферментативная активность глутатион-пероксидазы и супероксиддисмутазы снижалась на максимальной градации ДРС - 60%P<sub>тmax</sub>. Напротив, концентрация белковых SH-групп и активность карбонильных производных белков и, на максимальной градации ДРС увеличивалась. Заключение. Таким образом, при осуществлении резистивного дыхания на протяжении 20 минут, воспалительный ответ возникает на ДРС 40 и 60% P<sub>тmax</sub>, а окислительный стресс - на ДРС 60% P<sub>тmax</sub>.

**Ключевые слова:** резистивное дыхание, дополнительное респираторное сопротивление, провоспалительные цитокины, окислительный стресс.

### INFLAMMATION AND OXIDATIVE STRESS UNDER ADDITIONAL RESPIRATORY RESISTANCE

Byalovsky Yu. Yu., Rakitina I. S., Abalenikhina Yu. V., Shchulkin A. V.

Ryazan State Medical University, Ryazan, Russia

### SUMMARY

Resistive breathing with additional respiratory resistance (ARR) requires an increase in the power of the respiratory muscles. There is convincing evidence that pathophysiological changes in ARR conditions are associated with the generation of inflammatory processes and the initiation of oxidative stress mechanisms. The aim of the study was to investigate the formation of oxidative and inflammatory processes under conditions of different values of additional respiratory resistance. Material and methods. The study involved 24 people who performed resistive breathing either without resistance (control) or with resistive loads equivalent to 40 and 60% of P<sub>тmax</sub> for 20 minutes. In the leukocyte lysate, proinflammatory cytokines TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , relative changes in the level of carbonyl derivatives of proteins, protein SH groups, superoxide dismutase (SOD) activity, glutathione peroxidase were determined. Results. 20-minute resistive breathing with ARR of 40 and 60% P<sub>тmax</sub> increased the relative amount of proinflammatory cytokines TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ . Enzymatic activity of glutathione peroxidase and superoxide dismutase decreased at the maximum gradation of ARR - 60% P<sub>тmax</sub>. On the contrary, the concentration of protein SH-groups and the activity of carbonyl derivatives of proteins increased at the maximum gradation of ARR. Conclusion. Thus, when resistive breathing is performed for 20 minutes, the inflammatory response occurs at ARR of 40 and 60% P<sub>тmax</sub>, and oxidative stress - at ARR of 60% P<sub>тmax</sub>.

**Key words:** resistive breathing, additional respiratory resistance, proinflammatory cytokines, oxidative stress.

Увеличение работы дыхательных мышц характерно для напряженных физических упражнений всего тела, обострений хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) и бронхиальной астмы, а также во время усиленного дыхания с сопротивлением потоку [1]. Резистивное дыхание требует осуществление вдоха с дополнительным респираторным сопротивлением (ДРС), что приводит к увеличению мощности работы диафрагмы и вспомогательных дыхательных мышц для преодоления возникающей резистивной нагрузки.

Активные формы кислорода (АФК) образуются в виде продуктов в нормальных физиологических условиях вследствие частичного восстановления молекулярного кислорода [2]. Окислительный стресс определяется как макромолекулярное окислительное повреждение с нарушением окислительно-восстановительной сигнализации и обычно является результатом чрезмерной продукции АФК, нарушений митохондриальной энергетической продукции, дисбаланса окислительных и антиокислительных процессов или комбинации этих факторов [3]. Мишенями АФК, образующихся во время оксидативного стресса, являются клеточные биомолекулы, прежде всего липиды, белки, углеводы и ДНК [2, 3]. Непосредственно оценить уровень окислительного стресса довольно сложно, ввиду высокой реактивности АФК с очень быстрым периодом полураспада. В этой связи применяют косвенную методику их оценки, основанную на динамике уровня свободных радикалов, вторичным детергентам липидов, белков и нуклеиновых кислот, а также через оценку антиокислительных процессов [4]. Исходя из этого, для параметризации окислительного стресса крайне важно определить надежные индикаторы оксидативных процессов [4]. Исходя из системной организации окислительных механизмов, их маркеры могут отражать деятельность как антиокислительной системы (например, активность глутатион-пероксидазы, препятствующий накоплению вторичных детергентов и активность супероксиддисмутазы (СОД), акцептирующей супероксид-радикалы), так и системы окисления (определение концентрации восстановленных небелковых тиоловых групп, свидетельствующие об окислительных метаболических нарушениях, а также измерение карбониллов белка в качестве маркера окислительной модификации белковых молекул) [5].

ХОБЛ в настоящее время является серьезной и растущей проблемой здравоохранения и выступает третьей по численности причиной смерти во всем мире, включая Российскую Федерацию [6]. Имеются убедительные доказательства того, что патофизиологические механизмы развития ХОБЛ включают запуск воспаления и окислительного

стресса [7]. Воспалительные реакции, возникающие в легких на бактериальную или вирусную инфекцию, служат мощным триггером для генерации АФК или активных форм азота, которые вызывают окислительный стресс [8]. Оба типа радикалов способны вызывать окислительное повреждение белков, липидов и ДНК. У пациентов с ХОБЛ были обнаружены высокий уровень перекиси липидов, малонового диальдегида или карбонила белка и низкая концентрация глутатиона или общей антиоксидантной способности (АОС), что значительно коррелирует с тяжестью заболевания или величиной ДРС [9].

Окислительный стресс вносит свой вклад в патогенез ХОБЛ. Сообщалось об окислительной стимуляции экспрессии провоспалительных интерлейкинов (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ), а также фактора некроза опухоли (TNF) в легочной ткани пациентов с ХОБЛ [10]. В этой связи важно исследовать регуляцию активности провоспалительных цитокинов TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  в условиях окислительного стресса при обструктивных нарушениях дыхания.

Окислительный стресс на фоне действия ДРС в качестве ведущего механизма обусловлен метаболическим рефлексом со стороны дыхательных мышц, подвергающихся инспираторным резистивным нагрузкам, причем величина окислительного стресса зависела от величины ДРС [11]. Комбинация антиоксидантов снижает реакцию плазменных цитокинов у людей после инспираторной резистивной дыхательной нагрузки на уровне 75%P<sub>max</sub> [12]. Существенно, что разная интенсивность АФК по-разному влияет на силу дыхательных мышц: незначительный уровень АФК повышает силовые возможности скелетных мышц [13], в то время как интенсивные окислительные стимулы, например, при действии интенсивных резистивных нагрузок [12], значительно уменьшает работоспособность дыхательной мускулатуры [14]. Подтверждением этих фактов являются результаты экспериментов на животных, показавших, что свободные радикалы, высвобождавшиеся из утомленной диафрагмы, способствуют утомлению всех дыхательных мышц [9]. Превентивный прием в качестве антиоксиданта N-ацетилцистеина перед использованием значительных по величине резистивных дыхательных нагрузок или перед проведением напряженной физической деятельности, может уменьшить возникающее утомление диафрагмы [15]. Отмечено, что утомление диафрагмы на фоне окислительного стресса может иметь весьма пагубные последствия – у больных с тяжелой ХОБЛ часто развивается дыхательная недостаточность вследствие интенсивного утомления дыхательных мышц [16]. Приведенные выше исследования подтверждают, что окислительный

стресс может развиваться вследствие утомления дыхательных мышц в условиях реализации значительных величин резистивных дыхательных нагрузок.

Целью исследования было изучение формирования окислительных и воспалительных процессов в условиях разной величины дополнительно респираторного сопротивления.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследовании приняли участие 24 человека (из них - 13 мужчин и 11 женщин), не имевшие в анамнезе хронических пульмонологических заболеваний. Участники исследования заполняли специальную анкету, в которой подтверждали отсутствие хронических заболеваний, а также травм накануне исследования и отрицание факта приема каких-либо лекарств, включая антиоксиданты. Участники сообщили, что в период исследования они вели обычный образ жизни, и им было дано указание не заниматься какими-либо напряженными физическими упражнениями накануне и в день исследования. Локальный этический комитет ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России решением № 9 от 5 июня 2023 г. одобрил программу исследований.

При проведении исследования участники дышали либо без резистивной нагрузки (свободное дыхание, контроль), либо, в течение 20 минут с резистивными нагрузками, эквивалентными 40%P<sub>max</sub> и 60%P<sub>max</sub>, отражавшие «умеренные» и «значительные» величины ДРС соответственно. Участники получали однократную резистивную нагрузку за одно посещение, при этом порядок, в котором они получали ДРС, был рандомизированным. Испытуемые не знали порядка предъявления ДРС, а резистивное нагрузочное устройство было скрыто от глаз. Длительность резистивного дыхания (20 минут) была выбрана потому, что, согласно [9], именно эта продолжительность действия ДРС вызывает достоверное утомление диафрагмы.

Внутриротовое давление оценивалось с использованием моновакууметра WIKA-2-75 (Польша), который подключался к дыхательному каналу тренажера Int. Air. Medical (Франция). Сопротивление инспираторному потоку обеспечивалось специальными диафрагмами переменного размера, помещенными в порт вдоха тренажера. Инспираторные маневры для определения максимального внутриротового давления выполнялись в положении сидя, начинались из остаточного объема и продолжались в течение 3 с при полном закрытии дыхательного канала тренажера Int. Air. Medical (маневр Мюллера). Повторные попытки, проводились через 30 с и выполнялись до тех пор, пока три последовательных измере-

ния не отличались на 10% или 10 см вод. ст., в зависимости от того, что было наименьшим [17]. Наибольшее зарегистрированное значение использовалось для последующего анализа. В положении сидя участники подбирали оптимальное положение зажима для носа, исключающего носовое дыхание. Измерения в состоянии покоя продолжались в течение 2 минут, пока участники дышали через мундштук без предъявления ДРС. Для достижения целевых значений 40%P<sub>max</sub> и 60%P<sub>max</sub> затвор переменного размера регулировался по сечению диаметра дыхательного канала. Это продолжалось до тех пор, пока участники не достигали целевого значения внутриротового давления, которое отображалось на шкале моновакууметра перед ними и постоянно контролировалось испытуемыми, чтобы обеспечить адекватное развитие мощности вдоха. Участники поддерживали глубину и частоту дыхания, наиболее удобную для резистивного дыхания.

До и после предъявления ДРС из локтевой вены через постоянную канюлю отбирали 10 мл венозной крови. Кровь переносили в предварительно охлажденные пробирки APXLAV (Россия) объемом 6 мл, содержащие в качестве антикоагулянта K-3 EDTA. Образцы хранили во льду, а затем центрифугировали при 1800 об/мин в течение 20 минут (центрифуга CM-6M ELMi, Латвия) для отделения плазмы от форменных элементов. Затем плазму разделяли на аликвоты и хранили при -80°C (UniFreez, Корея) до проведения биохимических анализов.

Выделение мононуклеарных лейкоцитов из периферической крови проводилось путем седиментации в одноступенчатом градиенте плотности фиколл-урографина [18]. Методом вестерн-блот в лизате лейкоцитов оценивали относительное количество TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ . 20 мкг белков супернатанта клеточного лизата подвергали электрофорезу с использованием 7,5% TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit («Bio-Rad», США) в буферной системе Laemmli («BioRad», США). Детекцию белков TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  проводили с использованием первичных кроличьих поликлональных антител: AF7014 антитело к TNF $\alpha$ , DF6893 антитело к IL-1 $\alpha$ , AF5103 антитело к IL-1 $\beta$  (все антитела производства Affinity, Китай), разведение антител 1:200 в буферном растворе TBST («Bio-Rad», США), инкубация в течение 2 ч при 37°C. Визуализацию первичных антител осуществляли с использованием вторичных козлиных антител (Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, HRP, «Invitrogen», США) в разведении 1:4000 и инкубацией в течение 1 ч при комнатной температуре. Хемилюминесценцию фиксировали с помощью ChemiDocXRS+ («Bio-Rad», США). Интенсив-

ность полученных полос (бэндов) анализировали денситометрически с помощью программного обеспечения ImageLab («Bio-Rad», США).

Белковые карбонилы анализировали с использованием адаптированной версии методики [19]. Дубликаты образцов лизата лейкоцитов инкубировали с 2,4-динитрофенилгидразином в 2,5 М HCl в течение 1 часа в темноте. Лизатные бланки инкубировали только в 2,5 М HCl. Затем все образцы осаждали 20% трихлоруксусной кислотой на льду и центрифугировали при 10 000 g в течение 10 мин. С помощью набора для анализа белка Pierce BCA (Thermo Scientific) измеряли уровень карбонилированных модифицированных белков.

Концентрацию белковых SH-групп определяли по разнице между уровнем общих и низкомолекулярных (небелковых) SH-групп. Анализ содержания общих SH-групп в лизате лейкоцитов проводили по методу Элмана с 5,5'-дитиобис(2-нитро)-бензоатом (DTNB) в неденатурирующих условиях [20].

Активность глутатионпероксидазы определялась спектрофотометрическим методом (BioRad SmartSpec Plus, «BioRad», США) посредством измерения уменьшения оптической плотности опытного образца при 340 нм,  $t - 37^{\circ}\text{C}$  [21].

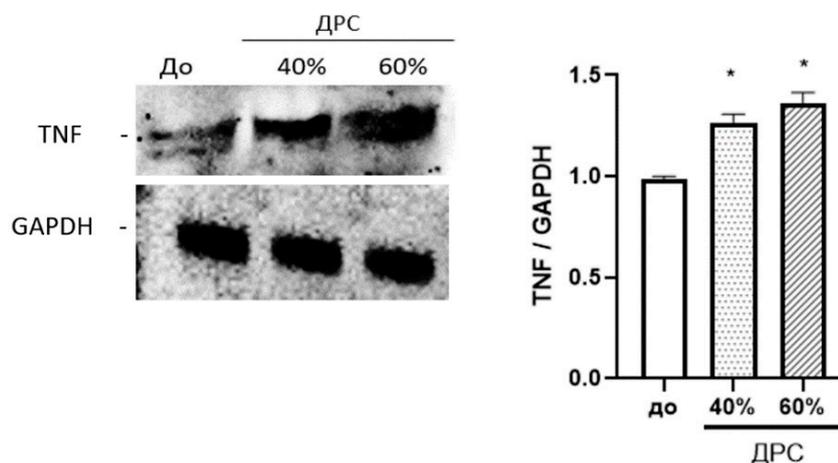
Определение активности супероксиддисмутазы осуществлялось кверцитиновым методом.

Степень снижения скорости реакции пропорциональна активности фермента в исследуемой пробе и рассчитывается по изменению оптической плотности реакционной среды, определяемой фотометрически [22].

Статистический анализ проводился с использованием SPSS для Windows, версия 24 (США). С помощью теста Шапиро-Уилка на нормальность статистические данные были рекомендованы к параметрическому анализу. Показатели испытаний с ДРС были проанализированы с использованием двусторонней процедуры ANOVA с повторными измерениями для определения эффектов факторов «времени» (исходный уровень/конечная минута) и «резистивной нагрузки» (40% P<sub>max</sub>/60% P<sub>max</sub>). Влияние организованного фактора оценивалось с помощью критерия F-статистики при уровне статистической значимости  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис. 1 и рис. 2 представлены маркеры воспалительного процесса при 20-минутном резистивном дыхании на ДРС величиной 40% P<sub>max</sub> и 60% P<sub>max</sub>. Как следует из приведенных данных, при увеличении ДРС относительное количество провоспалительных цитокинов TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  возрастало.



**Рис. 1.** Изменения относительного уровня TNF $\alpha$  в цитоплазматической фракции гомогената лейкоцитов при резистивном дыхании с ДРС 40% P<sub>max</sub> и 60% P<sub>max</sub>.

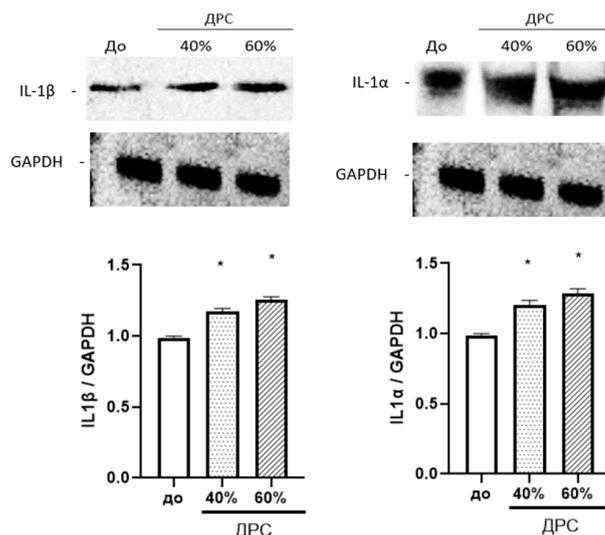
Обозначения: \* - достоверная разница с исходным фоном до резистивной нагрузки ( $p < 0,05$ ).

**Fig. 1.** Changes in the relative level of TNF $\alpha$  in the cytoplasmic fraction of leukocyte homogenate during resistive breathing with ARR 40% P<sub>max</sub> and 60% P<sub>max</sub>.

Designations: \* - evident difference from the initial background before the resistive load ( $p < 0.05$ ).

На рис. 1 приведены изменения относительного уровня TNF $\alpha$  в цитоплазматической фракции лизата лейкоцитов, оцениваемого методом вестерн-блот. При резистивном дыхании с ДРС 40% P<sub>max</sub> уровень TNF $\alpha$  возрастал на 26,7% ( $p < 0,05$ ) и при 60% P<sub>max</sub> – на 36,3% ( $p < 0,05$ ).

На рис. 2 приведены изменения относительного уровня IL-1 $\alpha$  и IL-1 $\beta$  в цитоплазматической фракции гомогената лейкоцитов, оцениваемого методом вестерн-блот. Как следует из рис. 2, при резистивном дыхании с ДРС 40% P<sub>max</sub>, относительное количество IL-1 $\alpha$  возрастало на 20,5%



**Рис. 2.** Изменения относительного уровня IL-1α и IL-1β в цитоплазматической фракции гомогената лейкоцитов при резистивном дыхании с ДРС 40% Pmax и 60% Pmax.

**Обозначения:** \* - достоверная разница с исходным фоном до резистивной нагрузки ( $p < 0,05$ ).

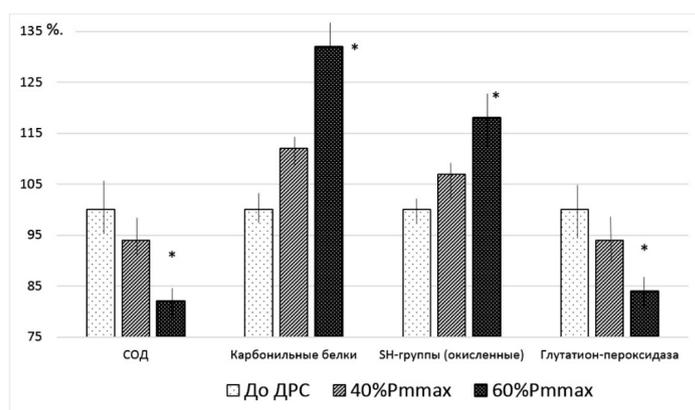
**Fig. 2.** Changes in the relative levels of IL-1α and IL-1β in the cytoplasmic fraction of leukocyte homogenate during resistive breathing with ARR 40% Pmax and 60% Pmax.

**Designations:** \* - evident difference from the initial background before the resistive load ( $p < 0.05$ ).

( $p < 0,05$ ), а с 60% Pmax - на 28,3% ( $p < 0,05$ ), а относительное количество IL-1β возрастало при ДРС 40% на 17,3% ( $p < 0,05$ ), с ДРС 60% Pmax - на 25,3% ( $p < 0,05$ ).

Динамика показателей активности антиокислительных систем при инспираторном резистивном дыхании представлены на рис. 3. Как следует из представленных данных, активность супероксиддисмутазы в пересчете на 106 клеток/мл суспензии после резистивного дыхания с нагрузкой 40% Pmax уменьшалась на 6,2% ( $p > 0,05$ ), а после реализации резистивной на-

грузки 60% Pmax - на 17,4% ( $p < 0,05$ ). Оценка изменений уровня карбонильных производных белков, показала увеличение показателей на 14,1% ( $p > 0,05$ ) и 22,5% ( $p < 0,05$ ) на ДРС 40 и 60% Pmax соответственно. Похожей была динамика уровня белковых тиоловых групп: на ДРС 40% Pmax показатель повышался на 8,2% ( $p > 0,05$ ), а после резистивного дыхания на ДРС 60% Pmax - на 32,5% ( $p < 0,05$ ). Активность глутатион-пероксидазы снижалась на 6,6% ( $p > 0,05$ ) при 40% Pmax и 15,2% при 60% Pmax ( $p < 0,05$ ).



**Рис. 3.** Относительные изменения уровня карбонильных производных белков и белковых SH-групп, активности супероксиддисмутазы (СОД), глутатион-пероксидазы при резистивном дыхании с ДРС 40% Pmax и 60% Pmax.

**Обозначения:** \* - достоверная разница с исходным фоном до ДРС ( $p < 0,05$ ).

**Fig. 3.** Relative changes in the level of carbonyl derivatives of proteins and protein SH groups, the activity of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase during resistive breathing with ARR 40% Pmax and 60% Pmax.

**Designations:** \* - evident difference from the initial background before DLS ( $p < 0.05$ ).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Целью этого исследования было изучить, влияет ли резистивное дыхание на уровень провоспалительных цитокинов и развитие окислительного стресса и зависит ли это влияние от величины резистивной нагрузки. Основным выводом заключался в том, что 20-минутное резистивное дыхание повышало относительное количество провоспалительных цитокинов TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , ( $p < 0,05$ ) цитоплазматической фракции гомогената лейкоцитов. Ферментативная антиокислительная активность супероксиддисмутазы и глутатион-пероксидазы уменьшалась после двадцати минут резистивного дыхания, а уровень маркеров окисления - карбонильных модификаций белка и белковых тиогрупп, напротив, увеличивалась, достигая достоверных различий с незатрудненным дыханием на ДРС 60% P $m_{max}$  ( $p < 0,05$ ).

В ходе 20-минутного резистивного дыхания мы наблюдали относительное повышение уровня карбониллов белков лизата, и концентрации окисленных SH-групп. Концентрация карбониллов ( $p > 0,05$ ) является маркером окисления белков. Период резистивного дыхания у крыс, обеспечивающий достоверное повышение концентрации карбониллов колеблется от 8 до 12 дней [23]. Кроме резистивных нагрузок, концентрация карбониллов вместе с увеличением других АФК, достоверно увеличивается и при действии физических нагрузок [24]. Ведущими факторами, обеспечивающими степень увеличения концентрации карбониллов белков плазмы, является интенсивность физических нагрузок на фоне резистивного дыхания во время тренировки и ее продолжительность [23]. Необходимо отметить, что общие физические тренировки нагружают большую часть скелетной мускулатуры тела, в то время как резистивное дыхание задействует преимущественно дыхательные мышцы. Говоря о кинетике концентрации карбониллов белка в условиях резистивных нагрузок, следует отметить такие процессы как протеосомная активность плазмы, уровень экскреции или поглощения тканями, которые обеспечивают карбонильный клиренс белков плазмы [23]. Необходимо подчеркнуть, что время после действия нагрузки имеет значение для развития окислительного стресса. Например, 50-минутная физическая тренировка привела к увеличению содержания карбониллов белка на 32% через 30 минут после тренировки и на 94% через 4 часа [9].

Активность супероксиддисмутазы и глутатион-пероксидазы является показателем антиоксидантной способности [25]. Ряд исследователей с использованием максимальных упражнений на

беговой дорожке не выявили изменений АОС плазмы сразу после физической тренировки [26]. Однако другие наблюдали значительное увеличение через 30 минут и 1 час [27]. Следовательно, время наблюдения изменений может иметь важное значение для измерения общей антиоксидантной способности.

Мы наблюдали достоверное увеличение содержания белковых SH-групп в лизате лейкоцитов после инспираторного дыхания с сопротивлением потоку на ДРС 60% P $m_{max}$ . Следует отметить, что белковые SH-группы способны акцептировать значительное количество АФК, что делает их измерение «золотым стандартом» для измерения выраженности окислительного стресса [19]. В этой связи белковые SH-группы являются весьма «чутким» маркером окислительного стресса и именно они обычно повышаются в мышечной ткани и плазме крови при интенсивных физических нагрузках [27]. Экспериментальные данные, полученные Supinski G. et al., [23], показали, что белковые SH-группы существенно увеличиваются в ткани диафрагмы у крыс, которые были подвергнуты длительному резистивному дыханию. Таким образом, мы делаем вывод, что увеличение содержания белковых SH-групп в лизате лейкоцитов, которое мы наблюдали после резистивного дыхания с сопротивлением потоку 60% P $m_{max}$ , отражает высвобождение их из сокращающихся дыхательных мышц в большой круг кровообращения. Важным обстоятельством следует считать то, что мы не наблюдали повышения уровня восстановленных SH-групп после инспираторного дыхания с сопротивлением потоку 40% P $m_{max}$ . Это может быть связано с интенсивностью ДРС, которое было недостаточным для того, чтобы наблюдать повышенную скорость появления АФК, превышающую способность антиоксидантов противодействовать их действию. Действительно, ранее сообщалось, что концентрации белковых SH-групп были выше после высокоинтенсивных периодических, а не постоянных циклических упражнений [28].

Говоря о взаимосвязи между маркерами окислительного стресса и утомлением дыхательной мускулатуры, считается, что основными механизмами резистивного метаболического рефлекса являются высвобождение из саркоплазматической сети Ca $^{2+}$ , снижение кальциевой чувствительности миофибрилл и/или прямое миолитическое повреждение волокон, связанных с перерастяжением мышечной ткани. Влияние АФК на сократительную активность мышц неоднозначно: низкое и кратковременное действие стимулирует силу и скорость сокращений [23], а интенсивное и длительное воздействие, например, в условиях резистивного дыхания [26], значительно снижает сократи-

тельную способность дыхательных мышц [9]. Действительно, исследования *in vitro* показали, что АФК, высвобождаемые из волокон диафрагмы, способствуют низкочастотному утомлению диафрагмы [23]. Прием антиоксиданта N-ацетилцистеина перед инспираторно-резистивным дыханием или тяжелыми физическими упражнениями также может снизить утомление дыхательных мышц [29]. Таким образом, мы предположили, что наблюдаемая нами разная степень окислительного стресса при различных интенсивностях ДРС, будет связана со степенью утомления диафрагмы. Источником повышения уровня АФК при резистивном дыхании также могут быть легкие, поскольку предыдущие исследования показали, что инспираторно-резистивное дыхание на животных моделях может привести к повреждению легких и окислительному стрессу [23].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

20-минутное резистивное дыхание с ДРС 40 и 60% P<sub>max</sub> повышало относительное количество провоспалительных цитокинов TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ . Ферментативная активность глутатион-пероксидазы и супероксиддисмутазы снижалась на максимальной градации ДРС - 60% P<sub>max</sub>. Напротив, концентрация белковых SH-групп и активность карбонильных производных белков и, на максимальной градации ДРС увеличивалась. Таким образом, при осуществлении резистивного дыхания на протяжении 20 минут, воспалительный ответ возникает на ДРС 40 и 60% P<sub>max</sub>, а окислительный стресс - на ДРС 60% P<sub>max</sub>.

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

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

### ЛИТЕРАТУРА

1. Бяловский Ю. Ю., Глотов С. И., Ракитина И. С., Ермачкова А. Н. Патогенетические аспекты фенотипирования бронхиальной астмы. Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. 2024;32(1):145-158. doi: 10.17816/PAVLOVJ181606.
2. Powers S. K., Ji L. L., Kavazis A. N., Jackson M. J. Reactive oxygen species: impact on skeletal muscle. *Compr Physiol*. 2011;1:941-969. doi:10.1002/cphy.c100054.
3. Powers S. K., Jackson M. J. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev*. 2008;88:1243-1276. doi:10.1152/physrev.00031.2007.
4. Palmieri B., Sblendorio V. Oxidative stress tests: overview on reliability and use. Part I. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci*. 2007;11:309-342.

5. Benjamin G., James B., Dominic J., Peter J., Kay L. Superoxide Dismutase 1 in Health and Disease: How a Frontline Antioxidant Becomes Neurotoxic. *Angew. Chem. Int. Ed*. 2021; 60, 9215–9246. doi:10.1002/anie.202000451

6. Чучалин А. Г., Авдеев С. Н., Айсанов З. Р. и др. Хроническая обструктивная болезнь легких: федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению. *Пульмонология*. 2022;32(3):356-392. doi:10.18093/0869-0189-2022-32-3-356-392.

7. Айсанов З. Р., Авдеев С. Н., Архипов В. В. и др. Национальные клинические рекомендации по диагностике и лечению хронической обструктивной болезни легких: алгоритм принятия клинических решений. *Пульмонология*. 2017;27(1):13-20. doi: 10.18093/0869-0189-2017-27-1-13-20.

8. Asimakos A., Toumpanakis D., Karatza M.H., Vasileiou S. et al. Immune cell response to strenuous resistive breathing: comparison with whole body exercise and the effects of antioxidants. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis*. 2018;13:529-545. doi:10.2147/COPD.S154533.

9. Bagni M. A., Colombini B., Nocella M., Pregno C., et al. The effects of fatigue and oxidation on contractile function of intact muscle fibers and myofibrils isolated from the mouse diaphragm. *Sci. Rep*. 2019;9:4422. doi:10.1038/s41598-019-39353-5.

10. Barreiro E., de la Puente B., Minguella J., Corominas J. M., et al. Oxidative stress and respiratory muscle dysfunction in severe chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med*. 2005;171:1116-1124. doi:10.1164/rccm.200407-887OC.

11. Domínguez-Álvarez M., Sabaté-Brescó M., Vila`-Ubach M., Gáldiz J. B., et al. Molecular and physiological events in respiratory muscles and blood of rats exposed to inspiratory threshold loading. *Transl. Res*. 2014; 163:478-493. doi:10.1016/j.trsl.2013.12.004.

12. Vassilakopoulos T., Katsaounou P., Karatza M.H., Kollintza A., et al. Strenuous resistive breathing induces plasma cytokines: role of antioxidants and monocytes. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med*. 2002;166:1572-1578. doi:10.1164/rccm.200203-177OC.

13. Cheng A. J., Yamada T., Rassier D. E., Andersson D. C., et al. Reactive oxygen/nitrogen species and contractile function in skeletal muscle during fatigue and recovery. *J. Physiol*. 2016;594:5149-5160. doi:10.1113/JP270650.

14. Reid M. B. Reactive oxygen species as agents of fatigue. *Med. Sci. Sports Exerc*. 2016;48: 2239-2246. doi:10.1249/MSS.0000000000001006.

15. Kelly M. K., Wicker R. J., Barstow T. J., Harms C. A. Effects of N-acetylcysteine on respiratory muscle fatigue during heavy exercise.

- Respir. Physiol. Neurobiol. 2009;165:67-72. doi:10.1016/j.resp.2008.10.008.
- 16 Gea J., Pascual S., Casadevall C., Orozco-Levi M., Barreiro E. Muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease: update on causes and biological findings. *J. Thorac. Dis.* 2015;7:E418-E438. doi:10.3978/j.issn.2072-1439.2015.08.04.
- 17 Mills D. E., Johnson M. A., McPhillimey M. J., Williams N. C., et al. The effects of inspiratory muscle training on plasma interleukin-6 concentration during cycling exercise and a volitional mimic of the exercise hyperpnea. *J. Appl. Physiol.* 2013;115:1163-1172. doi:10.1152/jappphysiol.00272.
18. Boyum A. Separation of blood leucocytes, granulocytes and lymphocytes. *Tissue Antigens.* 1974;4(4):269-74.
19. Yin H., Davis T., Porter N. A. Simultaneous analysis of multiple lipid oxidation products in vivo by liquid chromatographic-mass spectrometry (LC-MS). *Methods Mol. Biol.* 2010;610: 375-386. doi:10.1007/978-160327-029-8\_22.
20. BoschiMuller S., Azza S., Sanglier-Cianferani S., et al. A sulfenic acid enzyme intermediate is involved in the catalytic mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 2000;275(46):35908-35913.
21. Ланкин В. З., Гуревич С. М. Ингибирование перекисления липидов и детоксикация липоперекисей защитными ферментативными системами (супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы, глутатион-редуктазы) при экспериментальном злокачественном росте. *ДАН СССР.* 1976;226(3):705-708.
22. Костюк В.А., Потапович А.И., Ковалева Ж.В. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина. *Вопр. мед. химии.* 1990;36(2):88-91.
23. Supinski G., Nethery D., Stofan D., Hirschfield W., DiMarco A. Diaphragmatic lipid peroxidation in chronically loaded rats. *J. Appl. Physiol.* 1999;86:651-658. doi:10.1152/jappl.1999.86.2.651.
24. Мартусевич А. К., Суrowегина А. В., Кононец В. В., Давыдюк А. В., Перетягин С. П. Влияние глутатион-содержащего динитрозильного комплекса железа на состояние окислительного метаболизма и кристаллогенные свойства плазмы крови крыс: доклиническое экспериментальное исследование. *Кубанский научный медицинский вестник.* 2023;30(6):28-40. doi:10.25207/1608-6228-2023-30-6-28-40.
25. Kelly M. K., Wicker R. J., Barstow T. J., Harms C. A. Effects of N-acetylcysteine on respiratory muscle fatigue during heavy exercise. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 2009;165:67-72. doi:10.1016/j.resp.2008.10.008.
26. Falone S., Mirabilio A., Passerini A., Izzicupo P., et al. Aerobic performance and antioxidant protection in runners. *Int. J. Sports. Med.* 2009;30:782-788. doi:10.1055/s-0029-1233464.
27. Vider J., Lehtmaa J., Kullisaar T., Vihalemm T., et al. Acute immune response in respect to exercise-induced oxidative stress. *Pathophysiology.* 2001;7:263-270. doi:10.1016/S0928-4680(00)00057-2.
28. Done A. J., Newell M. J., Traustadóttir T. Effect of exercise intensity on Nrf2 signalling in young men. *Free Radic. Res.* 2017; 51:646-655. doi:10.1080/10715762.2017.1353689.
- 29 Cheng A. J., Yamada T., Rassier D. E., Andersson D. C., et al. Reactive oxygen/nitrogen species and contractile function in skeletal muscle during fatigue and recovery. *J. Physiol.* 2016;594:5149-5160. doi:10.1113/JP270650.

## REFERENCES

1. Byalovsky Yu. Yu., Glotov S. I., Rakitina I. S., Ermachkova A. N. Pathogenetic aspects of phenotyping bronchial asthma. *Rossijskij mediko-biologicheskij vestnik imeni akademika I. P. Pavlova.* 2024;32(1):145-158. (In Russ.). doi:10.17816/PAVLOVJ181606.
2. Powers S. K., Ji L. L., Kavazis A. N., Jackson M. J. Reactive oxygen species: impact on skeletal muscle. *Compr Physiol.* 2011;1:941-969. doi:10.1002/cphy.c100054.
3. Powers S. K., Jackson M. J. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev.* 2008;88:1243-1276. doi:10.1152/physrev.00031.2007.
4. Palmieri B., Sblendorio V. Oxidative stress tests: overview on reliability and use. Part I. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2007;11:309-342.
5. Benjamin G., James B., Dominic J., Peter J., Kay L. Superoxide Dismutase 1 in Health and Disease: How a Frontline Antioxidant Becomes Neurotoxic. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2021; 60, 9215–9246. doi:10.1002/anie.202000451
6. Chuchalin A. G., Avdeev S. N., Aisanov Z. R., et al. Chronic obstructive pulmonary disease: federal clinical guidelines for diagnosis and treatment. *Pulmonology.* 2022;32(3):356-392. (In Russ.). doi:10.18093/0869-0189-2022-32-3-356-392.
7. Aisanov Z. R., Avdeev S. N., Arkhipov V. V., et al. National clinical guidelines for the diagnosis and treatment of chronic obstructive pulmonary disease: an algorithm for making clinical decisions. *Pulmonology.* 2017;27(1):13-20. doi:10.18093/0869-0189-2017-27-1-13-20.
8. Asimakos A., Toumpanakis D., Karatza M.H., Vasileiou S. et al. Immune cell response to strenuous resistive breathing: comparison with whole body exercise and the effects of antioxidants. *Int. J.*

- Chron. Obstruct. Pulmon. Dis. 2018;13:529-545. doi:10.2147/COPD.S154533.
9. Bagni M. A., Colombini B., Nocella M., Pregno C., et al. The effects of fatigue and oxidation on contractile function of intact muscle fibers and myofibrils isolated from the mouse diaphragm. *Sci. Rep.* 2019;9:4422. doi:10.1038/s41598-019-39353-5.
10. Barreiro E., de la Puente B., Minguella J., Corominas J. M., et al. Oxidative stress and respiratory muscle dysfunction in severe chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 2005;171:1116-1124. doi:10.1164/rccm.200407-887OC.
11. Domínguez-Álvarez M., Sabaté-Brescó M., Vila`-Ubach M., Gáldiz J. B., et al. Molecular and physiological events in respiratory muscles and blood of rats exposed to inspiratory threshold loading. *Transl. Res.* 2014; 163:478-493. doi:10.1016/j.trsl.2013.12.004.
12. Vassilakopoulos T., Katsaounou P., Karatza M.H., Kollintza A., et al. Strenuous resistive breathing induces plasma cytokines: role of antioxidants and monocytes. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 2002;166:1572-1578. doi:10.1164/rccm.200203-177OC.
13. Cheng A. J., Yamada T., Rassier D. E., Andersson D. C., et al. Reactive oxygen/nitrogen species and contractile function in skeletal muscle during fatigue and recovery. *J. Physiol.* 2016;594:5149-5160. doi:10.1113/JP270650.
14. Reid M. B. Reactive oxygen species as agents of fatigue. *Med. Sci. Sports Exerc.* 2016;48: 2239-2246. doi:10.1249/MSS.0000000000001006.
15. Kelly M. K., Wicker R. J., Barstow T. J., Harms C. A. Effects of N-acetylcysteine on respiratory muscle fatigue during heavy exercise. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 2009;165:67-72. doi:10.1016/j.resp.2008.10.008.
16. Gea J., Pascual S., Casadevall C., Orozco-Levi M., Barreiro E. Muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease: update on causes and biological findings. *J. Thorac. Dis.* 2015;7:E418-E438, doi:10.3978/j.issn.2072-1439.2015.08.04.
17. Mills D. E., Johnson M. A., McPhillimey M. J., Williams N. C., et al. The effects of inspiratory muscle training on plasma interleukin-6 concentration during cycling exercise and a volitional mimic of the exercise hyperpnea. *J. Appl. Physiol.* 2013;115:1163-1172. doi:10.1152/jappphysiol.00272.
18. Boyum A. Separation of blood leucocytes, granulocytes and lymphocytes. *Tissue Antigens.* 1974;4(4):269-74.
19. Yin H., Davis T., Porter N. A. Simultaneous analysis of multiple lipid oxidation products in vivo by liquid chromatographic-mass spectrometry (LC-MS). *Methods Mol. Biol.* 2010;610: 375-386. doi:10.1007/978-160327-029-8\_22.
20. BoschiMuller S., Azza S., Sanglier-Cianferani S., et al. A sulfenic acid enzyme intermediate is involved in the catalytic mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 2000;275(46):35908-35913.
21. Lankin V. Z., Gurevich S. M. Inhibition of lipid peroxidation and detoxification of lipid peroxides by protective enzymatic systems (superoxide dismutase, glutathione peroxidase, glutathione reductase) during experimental malignant growth. *DAN SSSR.* 1976; 226(3):705- 708. (In Russ.).
22. Kostyuk V. A., Potapovich A. I., Kovaleva Zh. V. A simple and sensitive method for determining superoxide dismutase activity based on the oxidation reaction of quercetin. *Voprosy medicinskoj himii.* 1990;36(2):88-91. (In Russ.).
23. Supinski G., Nethery D., Stofan D., Hirschfield W., DiMarco A. Diaphragmatic lipid peroxidation in chronically loaded rats. *J. Appl. Physiol.* 1999;86:651-658. doi:10.1152/jappl.1999.86.2.651.
24. Martusevich A. K., Surovegina A. V., Kononets V. V., Davydyuk A. V., Peretyagin S. P. The influence of glutathione-containing dinitrosyl iron complex on the state of oxidative metabolism and crystallogenic properties of rat blood plasma: a preclinical experimental study. *Kubanskij nauchnyj medicinskij vestnik.* 2023;30(6):28-40. (In Russ.). doi:10.25207/1608-6228-2023-30-6-28-40.
25. Kelly M. K., Wicker R. J., Barstow T. J., Harms C. A. Effects of N-acetylcysteine on respiratory muscle fatigue during heavy exercise. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 2009;165:67-72. doi:10.1016/j.resp.2008.10.008.
26. Falone S., Mirabilio A., Passerini A., Izzicupo P., et al. Aerobic performance and antioxidant protection in runners. *Int. J. Sports. Med.* 2009;30:782-788. doi:10.1055/s-0029-1233464.
27. Vider J., Lehtmaa J., Kullisaar T., Vihalemm T., et al. Acute immune response in respect to exercise-induced oxidative stress. *Pathophysiology.* 2001;7:263-270. doi:10.1016/S0928-4680(00)00057-2.
28. Done A. J., Newell M. J., Traustadóttir T. Effect of exercise intensity on Nrf2 signalling in young men. *Free Radic. Res.* 2017; 51:646-655. doi :10.1080/10715762.2017.1353689.
29. Cheng A. J., Yamada T., Rassier D. E., Andersson D. C., et al. Reactive oxygen/nitrogen species and contractile function in skeletal muscle during fatigue and recovery. *J. Physiol.* 2016;594:5149-5160. doi:10.1113/JP270650.

## МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ВЕРИФИКАЦИЯ ХРОНИЧЕСКОГО ЭНДОМЕТРИТА ПРИ ГИПЕРПЛАЗИИ ЭНДОМЕТРИЯ

Волоцкая Н. И., Голубинская Е. П., Зяблицкая Е. Ю., Марулова А. В.

Центральная научно-исследовательская лаборатория Ордена Трудового Красного Знамени Медицинский институт им. С. И. Георгиевского федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского» (Медицинский институт им. С. И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В. И. Вернадского»), 295051, бул. Ленина, 5/7, Симферополь, Россия

**Для корреспонденции:** Зяблицкая Евгения Юрьевна, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории, Медицинский институт им. С. И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В. И. Вернадского», e-mail: evgu79@mail.ru

**For correspondence:** Evgeniia Yu. Ziablitskaia, MD, Leading Researcher at the Central Research Laboratory, Order of the Red Banner of Labor Medical Institute named after S. I. Georgievsky V. I. Vernadsky Crimean Federal

University (Medical Institute named after S. I. Georgievsky of Vernadsky CFU), e-mail: evgu79@mail.ru

### Information about authors:

**Volotskaya N. I.**, <http://orcid.org/0000-0003-2304-659X>

**Golubinskaya E. P.**, <https://orcid.org/0000-0003-3917-924X>

**Ziablitskaia E. Yu.**, <http://orcid.org/0000-0001-8216-4196>

**Marulova A. V.**, <http://orcid.org/0009-0000-4570-2848>

### РЕЗЮМЕ

Цель: продемонстрировать морфологические признаки хронического воспаления при железистой гиперплазии эндометрия при рутинной диагностике в клинике, оценить частоту распространения хронического эндометрита в данной группе пациенток и закономерности его структурных проявлений. Материал и методы. Для исследования был собран материал соскобов полости матки пациенток 25-63 лет с признаками гиперпластического процесса эндометрия по данным УЗИ. В исследование не были включены пациентки с интраэпителиальной неоплазией и атипической гиперплазией эндометрия, онкологическими и системными воспалительными процессами, применяющие гормональную терапию. Проведены морфологические методы верификации диагноза, методы иммуногистохимии (ИГХ), световой микроскопии, микросъемки, сканирования гистопрепаратов, морфометрия изображений. Гиперплазия эндометрия представляет собой комплекс морфологических изменений эндометрия с преимущественным увеличением соотношения эндометриальных желез к строме по сравнению с нормальным пролиферативным эндометрием. В связи с чем, доминирующим и единственным верифицирующим подходом к ее диагностике является патогистологический метод. Результаты. В данной статье представлены результаты взаимосвязи гиперплазии эндометрия и воспаления на морфологическом уровне. Приведенные в статье критерии морфологической диагностики могут быть внедрены в практику для оценки проявлений хронического воспаления при гиперплазии эндометрия, что особенно актуального для молодых женщин репродуктивного возраста. Заключение. Персонифицированный подход, основанный на ИГХ определении наличия воспаления эндометрия, позволяет отнести пациенток к различным группам, в зависимости от которых будет определен алгоритм введения пациенток, назначена патогенетическая терапия, что ценно для усовершенствования существующих профилактических, диагностических и лечебных подходов с применением молекулярно-морфологических методов комплексной диагностики гиперплазии эндометрия и подбора патогенетической терапии.

**Ключевые слова:** гиперплазия эндометрия, диагностика, иммуногистохимия, патоморфология, воспаление

### MORPHOLOGICAL VERIFICATION OF CHRONIC ENDOMETRITIS IN ENDOMETRIAL HYPERPLASIA

Volotskaya N. I., Golubinskaya E. P., Ziablitskaia E. Y., Marulova A.V.

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

### SUMMARY

Aim: to demonstrate the morphological signs of chronic inflammation in glandular endometrial hyperplasia during routine diagnostics in the clinic, to assess the frequency of chronic endometritis in this group of patients and the patterns of its structural manifestations. Material and methods. For the study, material was collected from scrapings of the uterine cavity of patients 25-63 years old with signs of endometrial hyperplastic process according to ultrasound data. The study did not include patients with intraepithelial neoplasia and atypical endometrial hyperplasia, cancer and systemic inflammatory processes using hormonal therapy. Morphological methods of diagnosis verification, methods of immunohistochemistry (IHC), light microscopy, microphotography, scanning of histological specimens, and image morphometry were carried out. Endometrial hyperplasia is a complex of morphological changes in the endometrium with a predominant increase in the ratio of endometrial glands to stroma compared to normal proliferative endometrium. In this connection, the dominant and only verifying approach to its diagnosis is the pathohistological method. Results. This article presents the results of the relationship between endometrial hyperplasia and inflammation at the

morphological level. The morphological diagnostic criteria presented in the article can be put into practice to assess the manifestations of chronic inflammation in endometrial hyperplasia, which is especially important for young women of reproductive age. Conclusion. A personalized approach based on IHC determination of the presence of endometrial inflammation allows patients to be classified into different groups, depending on which the algorithm for introducing patients will be determined, pathogenetic therapy will be prescribed, which is valuable for improving existing preventive, diagnostic and therapeutic approaches using molecular morphological methods of complex diagnosis of endometrial hyperplasia and selection of pathogenetic therapy.

**Key words:** endometrial hyperplasia, diagnostic, immunohistochemistry, pathomorphology, inflammation

Гиперплазия эндометрия (ГЭ) с атипией или без нее является распространенным гинекологическим диагнозом и известным предшественником рака эндометрия, наиболее распространенного гинекологического злокачественного новообразования [1; 2; 3]. В репродуктивном возрасте риск развития ГЭ повышают состояния, связанные с прерывистой или отсутствующей овуляцией, в частности синдром поликистозных яичников [1]. После менопаузы, ГЭ чаще встречается у женщин с заболеваниями, повышающими уровень циркулирующего эстрогена, такими как ожирение или заместительная эстрогеновая терапия [1; 4]. Женщины с ГЭ подвергаются повышенному риску как сопутствующего, так и последующего рака эндометрия [5]. ГЭ представляет собой комплекс морфологических изменений эндометрия с преимущественным увеличением соотношения эндометриальных желез к строме по сравнению с нормальным пролиферативным эндометрием. В связи с чем, доминирующим и единственным верифицирующим подходом к ее диагностике является патогистологический метод [6]. Часто встречающееся сочетание воспаления и ГЭ вносит затруднение в традиционные системы морфологической классификации ГЭ, демонстрирует широкую и разную степень диагностической воспроизводимости, и, как следствие, стандартизированное ведение пациентов может быть затруднительным. Эти диагностические неопределенности усложняют лечение ГЭ.

Аномальные маточные кровотечения в репродуктивных циклах и постменопаузальном периоде являются главным признаком патологии эндометрия и, в связи с актуальным поиском атипии или рака, требуют немедленной морфологической оценки ткани [7]. Важно отметить, что это позволяет в подавляющем большинстве случаев исключить явления начала или реализации трансформации нормальных эпителиальных клеток в опухолевые, происходящие вследствие избытка эстрогенов на фоне мутационной нагрузки [8]. При исключении атипии и рака, у женщин репродуктивного возраста, становятся наиболее привлекательными нехирургические методы лечения, особенно в случаях стремления к сохранению фертильности [9]. Иммуногистохимическая (ИГХ) оценка маркера CD 138 позволяет допол-

нить верификацию патоморфологических изменений путем визуализации ключевого показателя эндометрита. Мы предполагаем, что в будущем «панельный» подход комбинаций иммуногистохимических биомаркеров, может быть более информативным, чем узконаправленная диагностика, однако в данной работе считаем важным продемонстрировать особенности морфологических проявлений ГЭ в сочетании с эндометритом и без него. Цель исследования: продемонстрировать морфологические признаки хронического воспаления при железистой гиперплазии эндометрия при рутинной диагностике в клинике, оценить частоту распространения хронического эндометрита в данной группе пациенток и закономерности его структурных проявлений.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования являлись соскобы полости матки, полученные от пациенток в возрасте от 25 до 63 лет в ходе фракционного диагностического выскабливания под контролем гистероскопии (n=50).

Критерии включения: аномальное маточное кровотечение при регулярном менструальном цикле либо в климактерическом периоде; УЗИ признаки гиперпластического процесса в эндометрии (толщина эндометрия не менее 5-7 мм в 1 фазу менструального цикла (5-7 день) в репродуктивном возрасте пациенток, не менее 3-4 мм в постменопаузе; информированное согласие пациентки. Критерии исключения: эндометриоидная неоплазия или атипическая гиперплазия эндометрия, онкологические процессы; применение гормональной терапии, внутриматочных средств; инфекционная патология половых путей; клинические проявления системных аутоиммунных заболеваний.

Для исследований использованы морфологические методы верификации диагноза: общая гистологическая техника и ИГХ, методы световой микроскопии, микросъемки гистопрепаратов. Использованы стандартные протоколы для преаналитических методик, рекомендованные производителем реагентов для гистологической техники (Биовитрум, Россия). Для постановки ИГХ реакции был использован протокол для реакции с мышинным моноклональным антителом CD138

(Syndecan 1) клон М15 BOND RTU (демаскировка при pH буфера 6,0 в течение 20 минут, инкубация 15 минут).

Пациентки были систематизированы на две группы в зависимости от результата постановки ИГХ с маркером CD138 (плазматические клетки): CD138+ неатипическая железистая гиперплазия эндометрия (n=19) (наличие хронического эндометрита) и CD138- неатипическая железистая гиперплазия эндометрия (n=31) (отсутствие хронического эндометрита).

Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании. Исследование одобрено биоэтическим комитетом ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского» (Протокол № 6 от 03.06.2023 г).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате проведенного обзорного гистологического исследования соскобов полости матки было определено наличие неатипической железистой гиперплазии эндометрия очагового либо распространенного характера. Основными морфологическими критериями для верификации железистой гиперплазии без атипии являлись изменения как железистого, так и стромального компонентов (рис. 1):

1 – наличие неравномерного железистого компонента с соотношением желез к строме не менее чем 3:1;

2 – варибельность размеров и формы желез, наличие кистозной трансформации либо нарушение архитектоники желез с участками ветвления и других вариантов иррегулярности контура, эпителий желез пролиферативного типа с участками псевдостратификации, заметной митотической активностью (1-3 фигуры типических митозов в структуре);

3 – выстилка желез представлена преимущественно цилиндрическим эпителием с эозинофильной цитоплазмой, вытянутыми овоидными ядрами, ориентированными перпендикулярно базальной мембране;

4 – очаги метапластических изменений эпителиальной выстилки: эозинофильная, папиллярная, незрелая плоскоклеточная (в том числе морулярная), мерцательная, светлоклеточная, муцинозная;

5 – отсутствие цитологических признаков атипии, что проявляется в нормальном ядерно-цитоплазматическом соотношении, ровными контурами ядерной мембраны, отсутствии атипических митозов;

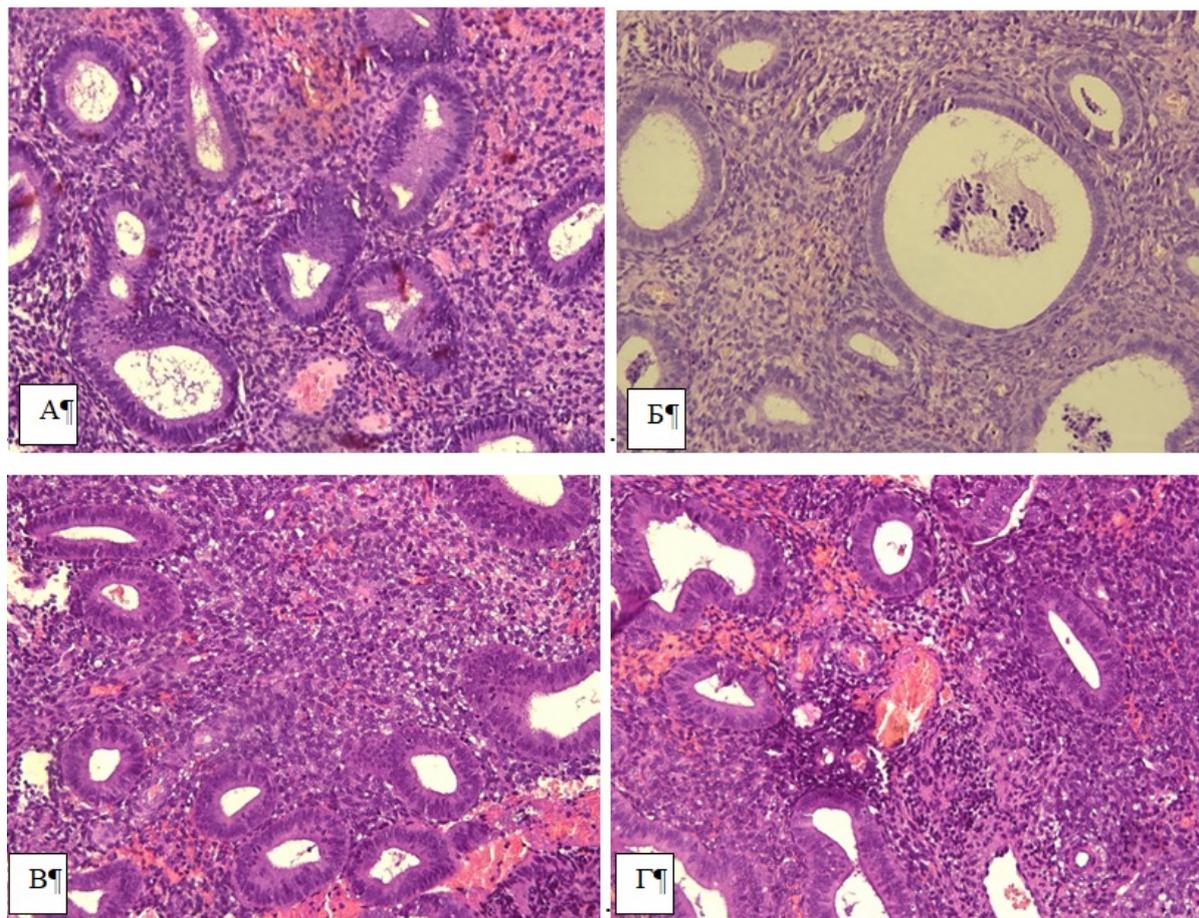
6 – строма скудная, с визуализацией базальных мембран желез.

Стромальный компонент представлен обилием различных клеточных элементов. Среди них

можно выделить иммунные и фибробластические клетки, наблюдается чередование участков стромы компактного строения и неравномерного отека. Характерно разрастание спиральных артерий, не свойственное ранней пролиферативной фазе цикла и менопаузальному эндометрию. Гемодинамические нарушения имеют различную степень выраженности и мозаичный характер, наблюдается чередование участков гиперемии и паретического расширения сосудов. Часть сосудов с явлениями сладжа эритроцитов, наличием тромбозов и кровоизлияний: от периваскулярных петехиальных до геморрагической инфильтрации.

В 27% случаев строма характеризуется чередованием участков отека и разрастания соединительнотканых волокон, до перигландулярного и периваскулярного фиброза с формированием муаровых структур. Количество клеточных элементов в данных очагах уменьшается, и в основном представлено популяцией фибробластоподобных клеток вытянутой формы с овоидными ядрами, умеренной эозинофильной цитоплазмой, либо веретенновидными клетками с заостренными овоидными ядрами по типу фиброцитов. В 9% случаев за счет ремоделирования стромы и гиперплазии железистого аппарата эндометрий формирует полиповидные выросты с наличием пучков утолщенных спиральных сосудов, а в 3 % на фоне полиповидной неатипической железистой гиперплазии определяется наличие железистых и/или железисто-фиброзных полипов эндометрия с фиброзно-сосудистыми основаниями и очаговыми проявлениями воспалительной инфильтрации, а также гемодинамических нарушений с тромбозами питающих сосудов, приводящих к очаговым некробиотическим изменениям, дистрофическому полиморфизму, явления реактивной атипии эпителия желез.

Иммунные клетки стромы диффузно располагаются в перигландулярных и периваскулярных пространствах, отмечается наличие очаговых лимфоидных скоплений вплоть до формирования лимфоидных агрегатов и даже фолликулов с расширенными герминативными центрами, что, по-нашему мнению, является следствием персистирующей антигенной стимуляции. Определяются участки интраэпителиальной инфильтрации. Лимфоциты представлены чаще малыми формами, в светлых зонах лимфоидных агрегатов определяется наличие лимфоцитов средних размеров по типу иммунобластов. В некоторых случаях на светооптическом уровне определяются единичные клетки с плазмоцитоподобной цитоплазмой, эксцентрически расположенным ядром и наличием перинун-



**Рис. 1. Соскоб полости матки. Неатипическая железистая гиперплазия эндометрия. Окраска гематоксилином и эозином. Ув.200х.**

А. Группа 1. CD138-, без явлений хронического эндометрита. Псевдостратификация эпителия. Типические митозы в эпителии желез.

Б. Группа 2. CD138+, с явлениями хронического эндометрита.

Кистозно-трансформированная железа, мерцательная метаплазия эпителия желез.

В. Группа 1. CD138-, без явлений хронического эндометрита.

Гиперемия спиральных артерий и сосуда синусоидального типа. Очаговые кровоизлияния.

Г. Группа 2. CD138+, с явлениями хронического эндометрита.

Очаг периваскулярного склерозирования стромы с лимфоидной инфильтрацией.

**Fig. 1. Scrape of the uterine cavity. Non-atypical glandular endometrial hyperplasia. Stained with hematoxylin and eosin. Magnification 200x**

A. Group 1. CD138-, without symptoms of chronic endometritis. Pseudostratification of the epithelium. Typical mitoses in the epithelium of glands.

Б. Group 2. CD138+, with symptoms of chronic endometritis. Cystic-transformed gland, ciliated metaplasia of the gland epithelium.

В. Group 1. CD138-, without symptoms of chronic endometritis. Hyperemia of spiral arteries and sinusoidal vessels. Focal hemorrhages.

Г. Group 2. CD138+, with symptoms of chronic endometritis. A focus of perivascular sclerosis of the stroma with lymphoid infiltration.

клеарного просветления. Данные клетки ИГХ методом идентифицированы как CD138+ плазмциты. Макрофагальная популяция представлена клетками средних размеров с эозинофильной цитоплазмой, округлым ядром с неровными

контурами и крупнодисперсным хроматином. В очагах некробиотического повреждения и перифокальных участках определяется примесь нейтрофильных гранулоцитов, инфильтрирующих эпителий желез.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Таким образом, в условиях клинически значимой эстрогении на светооптическом уровне в эндометрии происходит симуляция персистирующей пролиферативной фолликулиновой фазы менструального цикла, что сопровождается пролонгацией пролиферации желез с повышением митотической активности эпителия, увеличением количества желез и уменьшением площади стромального компонента, приводя к формированию неатипической железистой гиперплазии эндометрия как патологического процесса (рис. 2). Морфологическая картина эндометрия пациенток группы 2 (CD138+, с явлениями хронического эндометрита) существенно отличается степенью выраженности патологических изменений. При этом в этой группе установлено наличие полиморфизма изменений стромы эндометрия, проявлявшееся как в виде закономерного уменьшения количества стромальных элементов и сохранением общей цитогенности, так и в наличии очаговых или распространенных участков

структурного ремоделирования стромы за счет фиброзной трансформации и превалирования воспалительной инфильтрации. Данный факт, по нашему мнению, может быть связан с наличием хронического эндометрита в качестве фонового патологического процесса.

Исследование связи воспаления и пролиферации, опухолевой трансформации и активации канцерогенеза является актуальным вопросом фундаментальной и практической медицины, что отражено в монографиях и ведущих аналитических мировых обзорах [10-11]. А нами данный фундаментальный процесс проиллюстрирован на примере практической, социально и демографически значимой области деятельности авторов статьи в поликлинической работе и морфологической диагностике ГЭ и ее терапии для сохранения репродукции женщин. При широких возможностях вспомогательных репродуктивных технологий, важно помнить, что они базируются на рутинном купировании инфламаторных процессов, препятствующих решению репродуктивных задач [12].



Рис.2. Схематическое изображение механизма развития неатипической железистой гиперплазии эндометрия

Fig. 2. Schematic representation of the mechanism of development of non-atypical glandular endometrial hyperplasia

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, морфологическая диагностика в сочетании с ИГХ играет важную роль в постановке диагноза неатипической железистой гиперплазии эндометрия. Описанные нами явления хронического эндометрита, подтвержденные ИГХ методом, результаты которых подтвержда-

ют патофизиологические пути структурных изменений эндометрия, должны применяться с целью диагностики, что наиболее актуально для молодых женщин репродуктивного возраста. Персонифицированный подход, основанный на ИГХ определении наличия воспаления эндометрия, позволяет отнести пациенток к различным группам, в зависимости от которых будет опре-

делен алгоритм введения пациенток, назначена патогенетическая терапия (в данном случае этиотропная при наличии инфекций половых путей и патогенетическая нестероидными противовоспалительными препаратами при наличии воспаления), а также возможность предпринять меры профилактики прогрессии и развития эндометриальной аденокарциномы. На основании полученных данных возможна разработка эффективных предложений по совершенствованию терапии.

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Conflict of Interest.** The authors declare the absence of obvious or potential conflict of interest related to the publication of this article.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Armstrong A. J., Hurd W. W., Elguero S., Barker N. M., Zanotti K. M. Diagnosis and management of endometrial hyperplasia. *J Minim Invasive Gynecol.* 2012 Sep-Oct;19(5):562-71. doi:10.1016/j.jmig.2012.05.009.
2. World Health Organization. WHO classification of tumours, 5th edition, volume 4: female genital tumours. WHO; 2020. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34629493/> (Accessed Dec 29, 2023).
3. World Health Organization (WHO). Global Health Estimates 2020 : Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000–2019. – WHO, 2020. URL: <https://www.who.int/data/global-health-estimates> (Accessed Dec 29, 2023).
4. Siegel R. L., Miller K. D., Fuchs H. E., Jemal A. Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin.* 2022 Jan;72(1):7-33. doi:10.3322/caac.21708.
5. Sanderson P. A., Critchley H. O., Williams A. R., Arends M. J., Saunders P. T. New concepts for an old problem: the diagnosis of endometrial hyperplasia. *Hum Reprod Update.* 2017 Mar 1;23(2):232-254. doi: 10.1093/humupd/dmw042.
6. Stoenescu V. E., Niculescu M., Novac L., Manolea M. M., Tomescu P. I., Dijmărescu A. L., Novac M. B., Tudorache Ș., Iliescu D. G. Immunohistochemical reaction of the glandular epithelium in endometrial hyperplasia compared to endometrial carcinoma. *Rom J Morphol Embryol.* 2017;58(3):791-800.
7. Marnach M. L., Laughlin-Tommaso S. K. Evaluation and Management of Abnormal Uterine Bleeding. *Mayo Clin Proc.* 2019 Feb;94(2):326-335. doi:10.1016/j.mayocp.2018.12.012.
8. Baker W. D., Pierce S. R., Mills A. M., Gehrig P. A., Duska L. R. Nonoperative management of atypical endometrial hyperplasia and grade 1 endometrial cancer with the levonorgestrel

intrauterine device in medically ill post-menopausal women. *Gynecol Oncol.* 2017 Jul;146(1):34-38. doi:10.1016/j.ygyno.2017.04.006.

9. Owings R. A., Quick C. M. Endometrial intraepithelial neoplasia. *Arch Pathol Lab Med.* 2014 Apr; 138(4):484-91. doi:10.5858/arpa.2012-0709-RA.

10. Кубышкин А. В., Коваленко Е. П., Фомочкина И. И. и др. Гиперплазия эндометрия и воспаление: механизмы формирования пролиферативных процессов. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2023. doi: 10.33029/9704-7867-7-ЕИ-2023-1-112.

11. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* 2022 Jan;12(1):31-46. doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059.

12. Park H. J., Kim Y. S., Yoon T. K., Lee W. S. Chronic endometritis and infertility. *Clin Exp Reprod Med.* 2016 Dec;43(4):185-192. doi: 10.5653/cerm.2016.43.4.185.

### REFERENCES

1. Armstrong A. J., Hurd W. W., Elguero S., Barker N. M., Zanotti K. M. Diagnosis and management of endometrial hyperplasia. *J Minim Invasive Gynecol.* 2012 Sep-Oct;19(5):562-71. doi:10.1016/j.jmig.2012.05.009.
2. World Health Organization. WHO classification of tumours, 5th edition, volume 4: female genital tumours. WHO; 2020. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34629493/> (Accessed Dec 29, 2023).
3. World Health Organization (WHO). Global Health Estimates 2020 : Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000–2019. – WHO, 2020. URL: <https://www.who.int/data/global-health-estimates> (Accessed Dec 29, 2023).
4. Siegel R. L., Miller K. D., Fuchs H. E., Jemal A. Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin.* 2022 Jan;72(1):7-33. doi:10.3322/caac.21708.
5. Sanderson P. A., Critchley H. O., Williams A. R., Arends M. J., Saunders P. T. New concepts for an old problem: the diagnosis of endometrial hyperplasia. *Hum Reprod Update.* 2017 Mar 1;23(2):232-254. doi: 10.1093/humupd/dmw042.
6. Stoenescu V. E., Niculescu M., Novac L., Manolea M. M., Tomescu P. I., Dijmărescu A. L., Novac M. B., Tudorache Ș., Iliescu D. G. Immunohistochemical reaction of the glandular epithelium in endometrial hyperplasia compared to endometrial carcinoma. *Rom J Morphol Embryol.* 2017;58(3):791-800.
7. Marnach M. L., Laughlin-Tommaso S. K. Evaluation and Management of Abnormal Uterine Bleeding. *Mayo Clin Proc.* 2019 Feb;94(2):326-335. doi:10.1016/j.mayocp.2018.12.012.
8. Baker W. D., Pierce S. R., Mills A. M., Gehrig P. A., Duska L. R. Nonoperative management

of atypical endometrial hyperplasia and grade 1 endometrial cancer with the levonorgestrel intrauterine device in medically ill post-menopausal women. *Gynecol Oncol.* 2017 Jul;146(1):34-38. doi:10.1016/j.ygyno.2017.04.006.

9. Owings R. A., Quick C. M. Endometrial intraepithelial neoplasia. *Arch Pathol Lab Med.* 2014 Apr; 138(4):484-91. doi:10.5858/arpa.2012-0709-RA.

10. Kubyshkin A. V., Kovalenko E. P., Fomochkina I. I., et al. Endometrial hyperplasia

and inflammation: mechanisms of formation of proliferative processes. Moscow: GEOTAR-Media, 2023. (In Russ.). doi:10.33029/9704-7867-7-EHI-2023-1-112.

11. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* 2022 Jan;12(1):31-46. doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059.

12. Park H. J., Kim Y. S., Yoon T. K., Lee W. S. Chronic endometritis and infertility. *Clin Exp Reprod Med.* 2016 Dec;43(4):185-192. doi: 10.5653/cerm.2016.43.4.185.

## ОСЛОЖНЕНИЯ ХИРУРГИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ БОЛЬНЫХ ПОЧЕЧНО-КЛЕТОЧНЫМ РАКОМ

**Воробьев Н. В.<sup>1,2</sup>, Кульченко Н. Г.<sup>3</sup>, Толкачев А. О.<sup>1</sup>, Попов С. В.<sup>3</sup>, Салюков Р. В.<sup>3</sup>, Мяндина Г. И.<sup>3</sup>,  
Миронцев А. В.<sup>2</sup>, Ростовская В. В.<sup>2</sup>, Джандарова Т. И.<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава РФ, 105425, ул. Парковая 3-я, 51 стр. 4, Москва, Россия

<sup>2</sup>ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119048, ул. Трубецкая, 8, стр.2, Москва, Россия

<sup>3</sup>ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» (РУДН), 117198, ул. Миклухо-Маклая, д. 6, Москва, Россия

<sup>4</sup>ФГБУ Северо-Кавказский федеральный университет, 355017, ул. Пушкина, 1, Ставрополь, Россия

**Для корреспонденции:** Кульченко Нина Геннадьевна, кандидат медицинских наук, ст. преподаватель кафедры анатомии человека Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы»; e-mail:kle-kni@mail.ru

**For correspondence:** Nina Kulchenko, PhD, Associate Professor at the Department of Human Anatomy, RUDN University, e-mail:kle-kni@mail.ru

### Information about authors:

**Vorobyev N. V.**, <https://orcid.org/0000-0001-5597-9533>

**Kulchenko N. G.**, <https://orcid.org/0000-0002-4468-3670>

**Tolkachev A. O.**, <https://orcid.org/0000-0002-8630-6072>

**Popov S. V.**, <https://orcid.org/0000-0002-0567-4616>

**Salyukov R. V.**, <https://orcid.org/0000-0002-7128-6400>

**Myandina G. I.**, <https://orcid.org/0000-0002-7613-326X>

**Mirontsev A. V.**, <https://orcid.org/0000-0003-1783-694X>

**Rostovskaya V. V.**, <https://orcid.org/0000-0002-3718-8911>

**Dzhandarova T. I.**, <https://orcid.org/0000-0002-2734-2911>

### РЕЗЮМЕ

Доля почечно-клеточного рака (ПКР) среди всех онкологических заболеваний ежегодно увеличивается. Основным методом лечения ПКР – радикальная нефрэктомия при локализованном ПКР, которая дополняется удалением регионарных лимфатических узлов при местно-распространенном ПКР. Цель. Оценить ранние и поздние осложнения после хирургического лечения больных локализованным и местно-распространенным почечно-клеточным раком. Материал и методы. В этом исследовании был проведен анализ послеоперационных осложнений после хирургического лечения у больных (n=378) с доказанным клинически локализованным и местно-распространенным ПКР. Результаты. Всего осложнений после хирургического лечения больных локализованным и местно-распространенным ПКР было у 27(7,1%) пациентов. Причем, при лечении локализованной формы ПКР послеоперационные осложнения встречаются в 4,5 раза реже по сравнению с местно-распространенной формой ПКР (0,41 ОШ; ДИ 95% 0,16–1,3). Заключение. После хирургического лечения ПКР доля осложнений во второй группе выше, чем в первой. Наиболее часто встречается такое осложнение как кровотечение. В позднем послеоперационном периоде наиболее часто встречаются лимфоррея и инфекции мочевыводящих путей.

**Ключевые слова:** почечно-клеточный рак, кровотечение, послеоперационные осложнения, нефрэктомия, расширенная лимфаденэктомия.

### COMPLICATIONS OF SURGICAL TREATMENT OF PATIENTS WITH RENAL CELL CARCINOMA

**Vorobyev N. V.<sup>1,2</sup>, Kulchenko N. G.<sup>3</sup>, Tolkachev A. O.<sup>2</sup>, Popov S. V.<sup>3</sup>, Salyukov R. V.<sup>3</sup>,**

**Myandina G. I.<sup>3</sup>, Mirontsev A. V.<sup>2</sup>, Rostovskaya V. V.<sup>2</sup>, Dzhandarova T. I.<sup>4</sup>**

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

<sup>2</sup>Sechenov University, Moscow, Russia

<sup>3</sup>RUDN University, Moscow, Russia

<sup>4</sup>North Caucasus Federal University, Stavropol, Russia

### SUMMARY

The proportion of renal cell carcinoma (RCC) among all oncological diseases increases annually. The main method of treating RCC is radical nephrectomy for localized RCC, which is complemented by the removal of regional lymph nodes in locally advanced RCC. Aim. To evaluate early and late complications after surgical treatment of patients with

localized and locally advanced renal cell carcinoma. Material and methods. In this study, postoperative complications after surgical treatment were analyzed in patients (n=378) with clinically proven localized and locally advanced RCC. Results. A total of 27 (7.1%) patients had complications after surgical treatment of patients with localized and locally advanced RCC. Moreover, in the treatment of a localized form of RCC, postoperative complications are 4.5 times less common than the locally common form of RCC (0.41 OR; 95% CI 0.16–1.3). Conclusions. After surgical treatment of RCC, the proportion of complications is not high, but they can have unpleasant consequences. The most common complication is bleeding. In the late postoperative period, lymphorrhea and Urinary tract infection are most common.

**Key words:** renal cell carcinoma, bleeding, postoperative complications, nephrectomy, enlarged lymphadenectomy.

Почечно-клеточный рак (ПКР) – является одной из наиболее важных проблем онкоурологии из-за ежегодно возрастающей заболеваемости и смертности [1-3]. В структуре онкологических заболеваний доля ПКР составляет 4,1%. По темпам прироста заболеваемости ПКР устойчиво занимает четвертое место, уступая только опухолям предстательной железы, щитовидной железы, а также почек [4; 5].

Из-за генетической и биомолекулярной изменчивости ПКР имеет множество гистологических подтипов. Светлоклеточная карцинома, папиллярно-клеточная аденокарцинома (типы I и II) и хромофобно-клеточная карцинома являются тремя наиболее распространенными злокачественными опухолями почек, которые диагностируются приблизительно в 85–90 % случаев. Более редкими морфологическими типами ПКР являются папиллярная аденома, кистозная светлоклеточная карцинома, смешанная эозинофильная хромофобно-клеточная карцинома, почечная миелоидная карцинома и веретенноклеточная карцинома [6]. Гетерогенность ПКР способствует различной скорости роста ПКР, ее инвазии, чувствительности к препаратам и прогнозам.

Хирургический подход играет важную роль в лечении ПКР. Основной метод лечения ПКР – радикальная нефрэктомия [7; 8]. Принципы выполнения радикальной нефрэктомии включают раннюю перевязку почечной артерии и вены, удаление почки вместе с окружающей паранефральной клетчаткой, ипсилатерального надпочечника. Наличие метастазов ПКР в лимфатические узлы является одним из наиболее значимым неблагоприятным фактором, который снижает выживаемость больных до 5–30%, способствует риску метастазирования в отдаленные лимфатические узлы. Поэтому, при выполнении операции по поводу ПКР на ранних стадиях развития необходимо выполнение регионарной лимфаденэктомии. В этих случаях расширение объема операции удлиняет время операции, может способствовать увеличению объема кровопотери и развитию послеоперационных осложнений.

Цель исследования: оценить ранние и поздние осложнения после хирургического лечения

больных локализованным и местно-распространенным почечно-клеточным раком.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследование было включено 378 больных с клинически доказанным локализованным и местно-распространенным ПКР (по данным ультразвукового исследования и компьютерной томографии). Мы не включали в исследование пациентов с отдаленными метастазами.

В зависимости от вида хирургического лечения все пациенты были разделены нами на две группы:

1 группа: пациентам делали радикальную нефрэктомию без расширенной лимфаденэктомии (n = 126);

2 группа: пациентам делали радикальную нефрэктомию с расширенной лимфаденэктомией (n = 252).

У всех пациентов мы регистрировали количество и тяжесть развившихся осложнений в послеоперационном периоде: кровотечение, лимфоррея, инфекции мочевыводящих путей и т.д.

Статистический анализ.

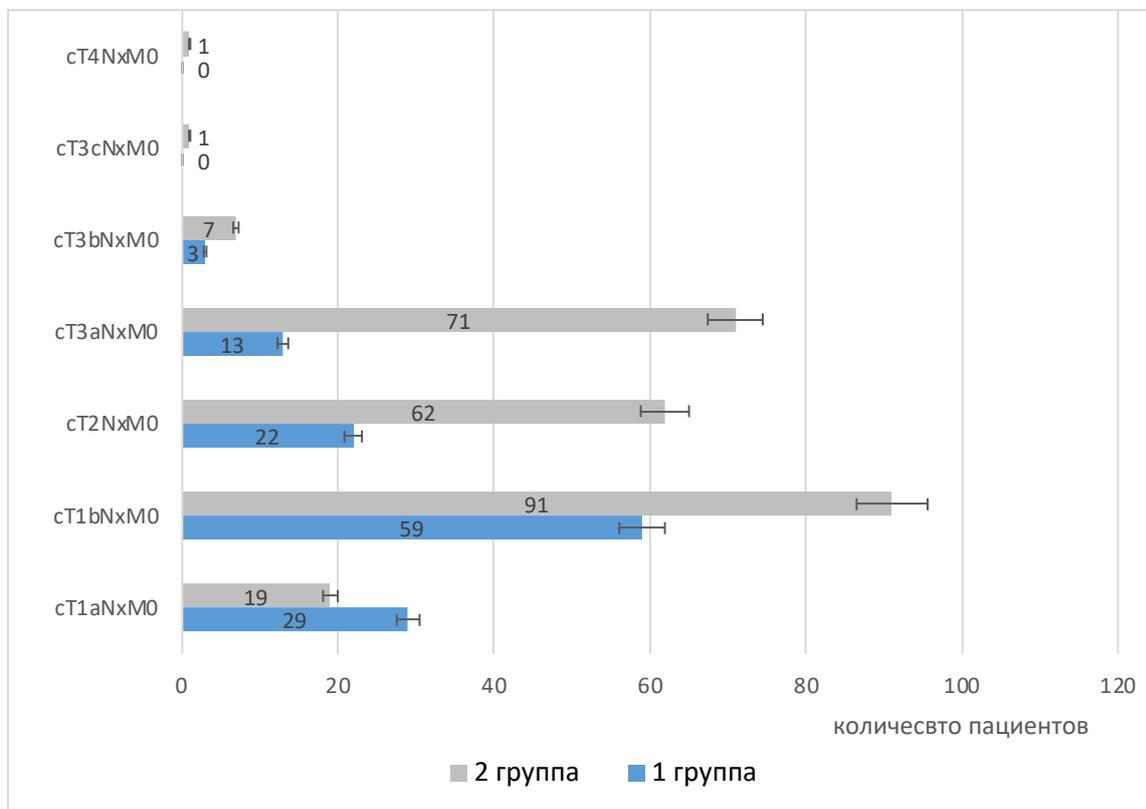
Полученные данные были обработаны в программе SPSS 12 (IBM Analytics, США). Количественные данные выражались в форме среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка. Тесноту связи признаков определяли с помощью однофакторного корреляционного анализа. Математическое представление взаимосвязи между независимой и зависимой переменными выражали в виде уравнения линейной регрессии. Статистически значимыми показателями считались при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В обеих группах преобладали пациенты с клиническим локализованным ПКР и размером опухоли почки от 4 см до 7 см (сT1b): в первой группе – 59 (46,8%), во второй группе – 91 (36,1%) ( $\chi^2=4,02$ ;  $p=0,045$ ). Число пациентов, у которых размер опухоли почки был более 7 см (сT2), было больше в 2,8 раза во второй группе по сравнению с первой: 62 (24,6%) против 22 (17,5%) соответственно ( $\chi^2=2,48$ ;  $p=0,116$ ). Пациентов с признаками выхода опухоли за пределы капсулы

почки, в паранефральную клетчатку (Т3а) так же было значимо больше во 2 группе пациентов: 71 (28,1%) против 13 (10,3%) ( $\chi^2=15,49$ ;  $p=0,001$ ). Распределение пациентов обеих групп с учетом клинической стадии заболевания представлено на рис. 1.

Длительность операции в объеме радикальная нефрэктомия с расширенной лимфаденэктомией была достоверно выше, и составила 171,3 + 46,9 мин у пациентов второй группы против времени хирургического вмешательства у пациентов первой группы - 142,4 + 39,3 мин ( $p<0,01$ ).



**Рис. 1. Распределение пациентов обеих групп с учетом клинической стадии заболевания.**  
**Fig. 1. Distribution of patients in both groups regarding the clinical stage of the disease.**

Осложнения после хирургического лечения больных локализованным и местно-распространенным ПКР были у 33 (8,7%) пациентов (рис. 2). Среди пациентов первой группы исследования осложнения были у 6 (4,7%) пациентов, у против 27 (7,1%) человек во второй группе ( $\chi^2=3,73$ ;  $p=0,05$ ). Таким образом, у пациентов первой группы шанс столкнуться с осложнениями после хирургического лечения ПКР составил 0,05 в первой группе пациентов, а во второй группе – 0,12 (0,41 ОШ; ДИ 95% 0,16–1,3).

Из всех осложнений наиболее часто мы встречали кровотечение (как во время операции, так и в ранний послеоперационный период): у 3 (2,3%) человек из первой группы и у 9 (3,5%) – из второй ( $\chi^2=0,38$ ;  $p=0,53$ ). Шанс появления кровотечения после хирургического лечения ПКР составил 0,02 у пациентов первой группы, во второй группе – 0,03 (0,65 ОШ; ДИ 95% 0,17–2,47). У 10 (2,6%) кровотечение было остановлено консервативно. Экстренная операция с целью коррекции гемо-

стаза потребовалась лишь 1 (0,4%) пациенту из второй группы.

Инфекция мочевыводящих путей после хирургического лечения ПКР встречалась чаще в 5 раз у пациентов второй группы по сравнению с первой ( $\chi^2=0,76$ ;  $p=0,38$ ). Шанс развития инфекции мочевыводящих путей после хирургического лечения ПКР у пациентов первой группы составил 0,008, во второй группе – 0,02 (0,39 ОШ; ДИ 95% 0,04–3,41).

В поздний послеоперационный период мы зафиксировали осложнения у 7 (1,8%) пациентов. В этот период наиболее чаще мы сталкивались с длительной лимфореей.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Стандартом лечения локализованного и местнораспространенного ПКР, является радикальная нефрэктомия [9]. Однако, ПКР размером до 4 см (соответствующие Т1а) имеют риск летального исхода в 5% в течение 5 лет без лечения [10]. По-

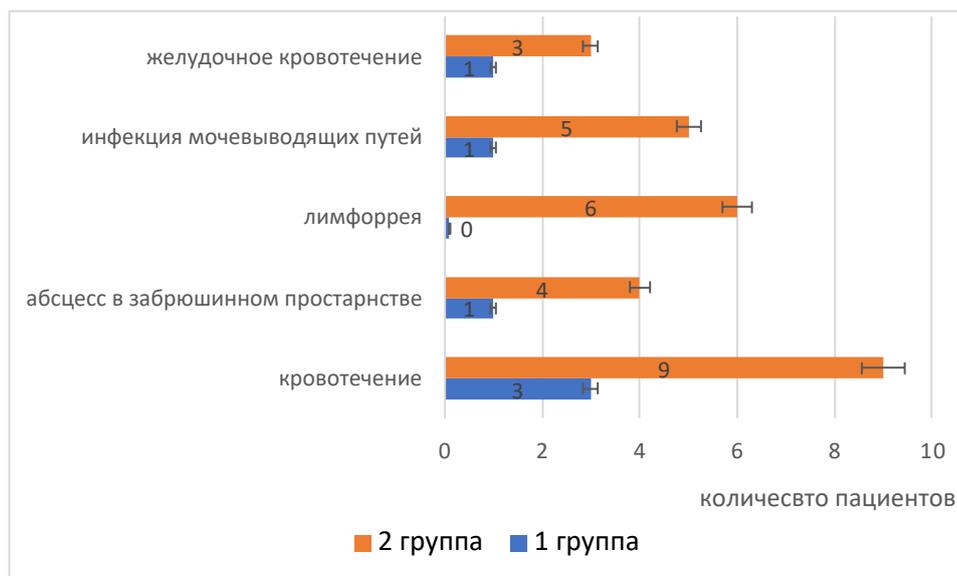


Рис. 2. Распределение пациентов обеих групп с учетом осложнений, развившихся после хирургического лечения

Fig. 2. Distribution of patients in both groups regarding complications those developed after surgical treatment

этому врачи все чаще используют расширенную лимфаденэктомию для улучшения результатов лечения ПКР. Добавление расширенной лимфаденэктомию к радикальной нефрэктомии улучшает 10-летнюю выживаемость больных с метастатическим поражением лимфатических узлов в несколько раз. При местно-распространенном ПКР лимфодиссекция выполняется как с целью точного определения стадии заболевания, так и с целью снижения частоты местных рецидивов и увеличения выживаемости больных. Однако, на фоне расширения объема операции при лечении ПКР возможно развитие осложнений как в раннем, так и в позднем послеоперационном периоде. Наше исследование показало, что те или иные осложнения встречаются у каждого 11 пациента при хирургическом лечении ПКР. Причем, при лечении локализованной формы ПКР послеоперационные осложнения встречаются в 3 раза реже по сравнению с местно-распространенной формой ПКР. По данным Wongvittavas N et al. послеоперационные осложнения при хирургическом лечении ПКР могут достигать 31% [11].

Кровотечение является одним из наиболее грозных осложнений радикальной нефрэктомии. Кровотечение часто развивается при выполнении расширенной лимфаденэктомию. Это чаще связано с повреждением ветвей аорты и нижней полой вены, поясничных и надпочечниковых сосудов. В нашем исследовании кровотечение развилось у 12 (3,1%) пациентов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

После хирургического лечения ПКР наиболее часто встречается такое осложнение как кровотечение. В позднем послеоперационном периоде наиболее часто встречаются лимфоррея и инфекции мочевыводящих путей

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

**Conflicts of interest.** The authors have no conflicts of interest to declare

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Song X. D., Tian Y. N., Li H., Liu B., Zhang A. L., Hong Y. Research progress on advanced renal cell carcinoma. *J Int Med Res.* 2020 Jun;48(6):300060520924265. doi:10.1177/0300060520924265.
2. Kulchenko N. G. Treatment of localized renal cancer. *South Russian Journal of Cancer.* 2020; 1(1):69-75. (In Russ.). doi:10.37748/2687-0533-2020-1-1-6.
3. Koryakin S., Petrushin K., Parshenkov M., Uruskhanova Z., Shchitkova A., Pechnikova E., Demyashkin G. Kidney morphofunctional features after ascorbic acid administration in a model of acute radiation nephropathy. *RUDN Journal of Medicine.* 2024;28(3):301-310. doi:10.22363/2313-0245-2024-28-3-37358
4. Demyashkin G.A., Uruskhanova Z.E., Koryakin S.N., Parshenkov M.A., Dubovaya T.K., Rodionova G.M., Shchekin V.I., Ivchenko Y.V., Ionova O.V. Renal proliferation and apoptosis against

ascorbic acid administration in a model of acute radiation nephropathy. *Morphology*. 2024;162(1). doi:10.17816/morph.629410.

5. Siegel R. L., Miller K. D., Jemal A. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2019 Jan;69(1):7-34. doi:10.3322/caac.21551.

6. Shuch B., Amin A., Armstrong A. J., et al. Understanding pathologic variants of renal cell carcinoma: distilling therapeutic opportunities from biologic complexity. *Eur Urol*. 2015;67:85-97. doi:10.1016/j.eururo.2014.04.029.

7. Shi N. P., Zu F., Shan Y., Chen S. Q., Xu B., Du M. L., Chen M. The value of renal score in both determining surgical strategies and predicting complications for renal cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Cancer medicine*. 2020; 9(11): 3944-3953. doi:10.1002/cam4.2993.

8. Kalapara A. A., Frydenberg M. The role of open radical nephrectomy in contemporary management of renal cell carcinoma. *Transl Androl Urol*. 2020 Dec;9(6):3123-3139. doi:10.21037/tau-19-327.

9. Ashrafi A. N., Gill I. S. Minimally invasive radical nephrectomy: a contemporary review. *Transl Androl Urol*. 2020 Dec;9(6):3112-3122. doi:10.21037/tau-2019-suc-16.

10. Surcel C., Mirvald C., Gingu C., Stoica R., Sinescu I. Management of small renal masses--update 2011. *J Med Life*. 2011 May 15;4(2):139-47.

11. Wongvittavas N., Panumatrassamee K., Opanuraks J., Usawachintachit M., Ratchanon S., Tantiwongse K., Bunyaratavej C., Santi-ngamkun A., Prasopsanti K. Predictive factors for postoperative complications in radical nephrectomy for renal cell carcinoma. *Asian biomedicine*. 2014;8(6):763-769. doi:10.5372/1905-7415.0806.355

## РОЛЬ ЦИТОКИНОВ И АПОПТОЗА ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ В МОДЕЛИ ОСТРОЙ ЛУЧЕВОЙ НЕФРОПАТИИ

Паршенков М. А.<sup>1</sup>, Корякин С. Н.<sup>2</sup>, Урусханова Ж. Э.<sup>1</sup>, Петрусевич Д. А.<sup>1</sup>, Сковородко П. П.<sup>1</sup>, Анурова М. Н.<sup>1</sup>, Родионова Г. М.<sup>1</sup>, Миронцев А. В.<sup>1</sup>, Ростовская В. В.<sup>1</sup>, Джандарова Т. И.<sup>3</sup>, Демяшкин Г. А.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119048, ул. Трубецкая, 8 стр.2, г. Москва, Россия.

<sup>2</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России, 249036, ул. Королева, д. 4, г. Обнинск, Россия.

<sup>3</sup>ФГБУ Северо-Кавказский федеральный университет, 355017, ул. Пушкина, д. 1, г. Ставрополь, Россия.

**Для корреспонденции:** Паршенков Михаил Алексеевич, специалист лаборатории гистологии и иммуногистохимии ИТМиБ Первого МГМУ им. И. М. Сеченова (Сеченовский Университет); e-mail: misjakj@gmail.com

**For correspondence:** Mike Parshenkov, Specialists of Department of Hystology, ITM of Sechenov University, e-mail: misjakj@gmail.com

### Information about authors:

Parshenkov M. A., <https://orcid.org/0009-0004-7170-8783>

Koryakin S. N., <https://orcid.org/0000-0003-0128-4538>

Uruskanova Z. E., <https://orcid.org/0009-0009-2291-3680>

Petrusevich D. A., <https://orcid.org/0009-0005-2283-6372>

Skovorodko P. P., <https://orcid.org/0009-0000-5624-4731>

Anurova M. N., <https://orcid.org/0000-0002-7649-9616>

Rodionova G. M., <https://orcid.org/0000-0002-0536-9590>

Mironov A. V., <https://orcid.org/0000-0003-1783-694X>

Rostovskaya V. V., <https://orcid.org/0000-0002-3718-8911>

Dzhandarova T. I., <https://orcid.org/0000-0002-2734-2911>

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

### РЕЗЮМЕ

Радиотерапия является важнейшим инструментом в арсенале современных методов лечения злокачественных новообразований. Между тем, применение ионизирующего излучения существенно повышает вероятность развития радиационно-индуцированной нефропатии, обусловленной уникальной радиочувствительностью почечной ткани. Глубокое понимание молекулярных и клеточных механизмов, лежащих в основе радиационного повреждения почечных структур, является критически важным для разработки стратегий, направленных на уменьшение побочных эффектов радиотерапии, и, как следствие, повышения её клинической эффективности. Цель. Оценка уровней цитокинов и апоптоза после введения аскорбиновой кислоты в модели радиационно-индуцированной нефропатии. Материал и методы. В экспериментальной модели использовали 130 самцов крыс линии Wistar, которые были разделены на следующие группы: I – контрольная (интактная) группа (n=15); II – группа, подвергшаяся облучению в разовой очаговой дозе 2 Гр (РОД 2 Гр) (n=25); III – облучение, РОД 8 Гр (n=25); IV – облучение, РОД 2 Гр + аскорбиновая кислота (интраперитонеальная инъекция; доза 50 мг / кг) (n=25); V – облучение, РОД 8 Гр + аскорбиновая кислота (интраперитонеальная инъекция; доза 50 мг / кг) (n=25); VI – аскорбиновая кислота (интраперитонеальная инъекция; доза 50 мг / кг) (n=15). Микропрепараты почек окрашивали гематоксилином и эозином. Кроме того, проводили иммуногистохимическую оценку уровня экспрессии IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-4. В сыворотке крови определяли уровни IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ . В гомогенате почечной ткани определяли уровни каспаза-3 и p53. Результаты. В ходе серологического анализа было зафиксировано увеличение уровней IL-1 $\beta$ , IL-6 и TNF- $\alpha$  после воздействия электронами с РОД 2 Гр и РОД 8 Гр, однако их концентрация статистически значимо снижалась при предварительном введении аскорбиновой кислоты. Аналогичные изменения были выявлены при иммуногистохимическом анализе, где отмечалось увеличение числа IL-1 $\beta$ -, IL-6- и TNF- $\alpha$ -позитивных клеток в сосудах клубочках, а также в эпителиальных клетках проксимальных и дистальных канальцев нефрона. Обсуждение. В настоящем исследовании предлучевое введение аскорбиновой кислоты способствовало снижению экспрессии провоспалительных цитокинов и ингибированию апоптоза, что в совокупности приводило к нивелированию радиационного повреждения почки. Эти результаты подчеркивают потенциал использования аскорбиновой кислоты в качестве одного из эффективных средств для профилактики ранней или поздней лучевой нефропатии. Заключение. Предлучевое введение аскорбиновой кислоты в модели острой лучевой нефропатии приводит к снижению уровней провоспалительных цитокинов в крови и в структурах почки, что также сопровождается модуляцией терминальной стадии апоптоза. Полученные данные серологического и молекулярно-биологического исследований не исключают радиопротективное действие аскорбиновой кислоты на структуры почки при облучении электронами.

**Ключевые слова:** лучевая нефропатия, облучение электронами, почки, аскорбиновая кислота, цитокины, апоптоз

**THE ROLE OF CYTOKINES AND APOPTOSIS AFTER ASCORBIC ACID INTRODUCING IN A MODEL OF ACUTE RADIATION NEPHROPATHY****Parshenkov M. A.<sup>1</sup>, Koryakin S. N.<sup>2</sup>, Uruskhanova Z. E.<sup>1</sup>, Petrusevich D. A.<sup>1</sup>, Skovorodko P. P.<sup>1</sup>, Anurova M. N.<sup>1</sup>, Rodionova G. M.<sup>1</sup>, Mirontsev A. V.<sup>1</sup>, Rostovskaya V. V.<sup>1</sup>, Dzhandarova T. I.<sup>3</sup>, Demyashkin G. A.<sup>1,2</sup>**<sup>1</sup>First Moscow State Medical University named after I. M. Sechenov (Sechenov University), Moscow, Russia.<sup>2</sup>National Medical Research Center for Radiology, Obninsk, Russia.<sup>3</sup>North Caucasus Federal University, Stavropol, Russia.**SUMMARY**

Radiotherapy stands as a cornerstone in the contemporary treatment landscape for malignant neoplasms. However, the application of ionizing radiation markedly elevates the risk of developing radiation-induced nephropathy, attributable to the inherent radiosensitivity of renal tissues. A comprehensive understanding of the molecular and cellular mechanisms that govern radiation-induced damage to renal structures is paramount. Such insights are crucial for the formulation of targeted strategies that mitigate the adverse effects of radiotherapy, thereby enhancing its therapeutic efficacy and clinical outcomes. Aim. Investigation of the impact of ascorbic acid administration prior to radiotherapy on cytokine levels in an experimental model of radiation-induced nephropathy. Material and methods. 130 male Wistar rats were divided into the following groups: I - control (intact) group (n=15); II - irradiation, 2 Gy dose (n=25); III - irradiation, 8 Gy dose (n=25); IV - irradiation, 2 Gy dose + ascorbic acid (intraperitoneal injection; dose 50 mg/kg) (n=25); V - irradiation, 8 Gy dose + ascorbic acid (intraperitoneal injection; dose 50 mg/kg) (n=25); VI - ascorbic acid (intraperitoneal injection; dose 50 mg/kg) (n=15). Kidney slides were stained with H&E. In addition, immunohistochemical evaluation of the expression rate of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-4 was performed. The levels of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  were determined in serum. Caspase-3 and p53 levels were determined in renal tissue homogenate. Results. Serological study revealed an increase in IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$  after irradiation at doses of 2 Gy and 8 Gy. The concentration of these cytokines statistically decreased with the administration of ascorbic acid prior to irradiation. Immunohistochemical analysis showed comparable results, with a notable increase in the number of IL-1 $\beta$ -, IL-6-, and TNF- $\alpha$ -positive cells observed within the vascular tubules, as well as in the epithelium of the nephron's proximal and distal tubules. Discussion. In the present study, pre-radiation administration of ascorbic acid reduced the release of pro-inflammatory signaling molecules and inhibited apoptosis, which together contributed to mitigating the radiation-induced damage to the kidneys. These results emphasise the potential of ascorbic acid as one of the effective agents for the prevention of early or late radiation nephropathy. Conclusion. Pre-radiation administration of ascorbic acid in the model of acute radiation nephropathy results in a reduction of proinflammatory cytokine levels in both blood and kidney tissues, which is also accompanied by modulation of the terminal stage of apoptosis. The obtained data of serological and molecular-biological studies do not exclude the radioprotective effect of ascorbic acid on kidney structures under electron irradiation.

**Key words: radiation nephropathy, electron irradiation, kidney, ascorbic acid, cytokines, apoptosis**

Радиотерапия, как и химиотерапия, является одним из методов диагностики и лечения злокачественных новообразований (ЗНО) в том числе в экспериментальных исследованиях [1]. Однако использование ионизирующего излучения (ИИ) наряду с положительными эффектами связано с определенным риском развития острых или хронических постлучевых осложнений, особенно в радиочувствительных органах, например почках [2].

При гамма-облучении почки на ранних сроках наблюдаются морфофункциональные изменения гломерулярного аппарата и нефронов, а на поздних – развития фиброза [3]. Одновременно, литературные данные о воздействии электронов на структуры почки малочисленны.

После воздействия электронов запускаются прямой и косвенный механизмы повреждения клеток [4]. Прямое действие на клетку приводит к разрывам ДНК, а косвенное способствует радиолитизу клеточной воды, что ведет к образованию свободных радикалов, а также реактивных форм

кислорода (РФК), которые инициируют многочисленные повреждения клеточных структур и генетического материала [5]. Одновременно, выброс свободных радикалов в системный кровоток дополнительно увеличивает вероятность возникновения окислительного стресса в других органах. При этом, в организме активируется экспрессия натуральных антиоксидантов, таких как супероксиддисмутаза, глутатион, каталаза и др. Увеличение концентрации РФК на фоне снижения действия защитных механизмов усиливает клеточное повреждение, вплоть до апоптоза и/или некроза [6; 7].

Как следствие, в крови и тканях увеличивается продукция провоспалительных цитокинов, таких как IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  и др., что повышает проницаемость эндотелия и продукцию циклооксигеназы-2 (ЦОГ-2), активируя запуск апоптотических сигнальных путей [8]. Воспалительная реакция увеличивает площадь поражения и косвенно усиливает действие радиационного повреждения клеток. Снижение степени стромально-со-

судистой реакции зависит от продукции провоспалительных цитокинов, которое направлено на уменьшение разрушения клеточных структур. Возможно, подобным эффектом обладают антиоксидантные препараты, например аскорбиновая кислота (АК) [9, 10]. АК способна восстанавливать повреждения ДНК, за счет ингибирования образования димеров тимина, а также смягчать токсическое действие излучения [11].

Однако, влияние АК, в первую очередь на маркеры оксидативного стресса, инициированного воздействием электронами в модели лучевой нефропатии, остается малоизученной.

Цель исследования: оценка уровней цитокинов и апоптоза после введения аскорбиновой кислотой в модели радиационно-индуцированной нефропатии.

Задачи исследования – определить концентрацию белков на фоне введения аскорбиновой

кислоты перед однократным локальным облучением электронами в разовых очаговых дозах (РОД) 2 Гр и 8 Гр: 1) про- (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) и противовоспалительных (IL-10, IL-4) цитокинов в структурах почки; 2) провоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) в сыворотке крови; 3) уровни каспазы-3 и p53 в гомогенате почек.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Дизайн эксперимента.

Самцы крысы линии Wistar (возраст 9–10 недель, вес 220  $\pm$  20 г; n=130) содержались в виварии с контролируемыми условиями среды, включая постоянную температуру 22°C и стандартный световой цикл (12L:12D). Животные имели свободный доступ к воде и корму. Для эксперимента крысы были случайным образом распределены на шесть различных групп (табл. 1).

Таблица 1. Дизайн эксперимента.

Table 1. Experiment design.

Группа   Group	n	Характеристика группы   Group characterisation
I группа   Group I	15	Группа контроля   Control group;
II группа   Group II	25	Животных подвергали однократному локальному облучению электронами в РОД 2 Гр   Animals were subjected to a single local irradiation with electrons at dose 2 Gy;
III группа   Group III	25	Животных подвергали однократному локальному облучению электронами в РОД 8 Гр   Animals were subjected to a single local irradiation with electrons at dose 8 Gy;
IV группа   Group IV	25	Перед однократным локальным облучением электронами в РОД 2 Гр животным вводили аскорбиновую кислоту (интраперитонеальная инъекция; доза 50 мг / кг)   Prior to a single local irradiation with electrons at dose 2 Gy, the animals were administered ascorbic acid (intraperitoneal injection; dose 50 mg/kg);
V группа   Group V	25	Перед однократным локальным облучением электронами в РОД 8 Гр животным вводили аскорбиновую кислоту (интраперитонеальная инъекция; доза 50 мг / кг)   Prior to a single local irradiation with electrons at dose 8 Gy, the animals were administered ascorbic acid (intraperitoneal injection; dose 50 mg/kg);
VI группа   Group VI	15	Животным вводили аскорбиновую кислоту (интраперитонеальная инъекция; доза 50 мг / кг)   The animals were administered ascorbic acid (intraperitoneal injection; dose 50 mg/kg).

Все манипуляции осуществляли 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) и Руководствам по проведению медико-биологических исследований по уходу и использованию лабораторных животных (ILAR, DELS), Правилам лабораторной практики и при-

казу Министерства здравоохранения РФ № 199н от 01.04.2016 «Об утверждении правил лабораторной практики». Исследование одобрено «Комиссией НМИЦ Радиологии по биоэтическому контролю за содержанием и использованием лабораторных животных в научных целях» (протокол № 6 от 27.04.23).

Облучение животных проводилось с использованием импульсного электронного ускорителя «NOVAC-11» (S.I.T. Sordina IORT Technologies S.P.A., Италия) в отделе радиационной биофизи-

зики МРНЦ им. А.Ф. Цыба. Аппарат позволяет генерировать электронные пучки с регулируемыми параметрами энергии и коллимации. Для проведения настоящего исследования были установлены следующие параметры: энергия пучка 10 МэВ, частота импульсов 9 Гц, диаметр коллимации 40 мм, что позволило обеспечить точечное и безопасное облучение целевой зоны почек крыс.

Дозы и режим облучения (РОД 2 Гр и РОД 8 Гр; однократно) были выбраны после предварительной апробации [12].

Оптимальная доза аскорбиновой кислоты (Армавирская Биофабрика ФКП, Россия; 50 мг/кг) была установлена экспериментально, основываясь на предварительных испытаниях подбора доз, в ходе которых тестировались следующие дозы: 30 мг/кг, 50 мг/кг, 100 мг/кг, 200 мг/кг. Основой послужила средняя эффективная доза для человека (Дср<sub>э</sub>), после чего производили перерасчет на кг/массы тела. Получившееся значение переводили в эквивалентную дозу для лабораторных животных (крыс) при помощи коэффициентов согласно руководству по доклиническим исследованиям ЛП [13].

Перед проведением облучения всем животным из экспериментальных групп вводили седативные препараты: кетамин (Московский эндокринный завод, Россия; 50 мг/кг, внутримышечно) и ксилазин (Alfasan International B.V., Нидерланды; 5 мг/кг, внутрибрюшечно).

После введения анестезии, животных индивидуально укладывали на исследовательский столик в положении на животе с разведенными лапами, что обеспечивало оптимальный доступ к необходимой области почек. Для фиксации и предотвращения движения животных во время процедуры использовались специальные удерживающие устройства (запатентованные салазки). Остальные части тела, не попадающие в зону облучения, включая сердце и легкие, были экранированы для создания радиационной тени. Для обеспечения высокой точности облучения, тубус аппарата располагали на расстоянии менее двух миллиметров от поверхности кожного покрова, направляя его строго перпендикулярно к исследуемой области.

#### *Выведение животных из эксперимента.*

Животные всех групп были выведены из исследования на 7-е сутки с использованием высоких доз анестетиков: кетамин (50 мг/кг, внутримышечно) и ксилазин (5 мг/кг, интраперитонеально). Эта процедура была тщательно спланирована для обеспечения быстрого и безболезненного прекращения жизнедеятельности, минимизируя стресс и дискомфорт у подопытных животных. Одну почку хранили при температуре -80 °С для дальнейшей оценки биомаркеров антиоксидан-

тов, провоспалительных медиаторов, маркеров апоптоза.

#### *Оценка маркеров воспаления.*

В сыворотке крови животных определяли уровень цитокинов IL-1 $\beta$ , IL-6 (Bender MedSystems, Вена, Австрия), TNF- $\alpha$  (Assaypro, Миссури, США) с помощью коммерческих приборов для проведения ИФА в соответствии с инструкцией производителя.

#### *Оценка маркеров апоптоза.*

В гомогенате почечной ткани с помощью коммерческого набора ИФА определяли уровни каспазы-3 и p53. Анализ проводили в соответствии с инструкцией производителя. Планшеты считывали при 450 нм с помощью микропланшетного ридера ELISA (Bio-Tek, США).

#### *Гистологическое исследование.*

Другую почку помещали в раствор забуференного формалина для фиксации. После этого ткани обрабатывали с помощью аппарата для гистологической проводки (Leica Biosystems, Германия) и заливали в парафиновые блоки. Затем из подготовленных блоков изготавливали серийные срезы толщиной 3 мкм, которые подвергались процедурам депарафинизации и дегидратации. Окончательное окрашивание срезов проводилось с использованием гематоксилина Майера и эозина (H&E) для дальнейшего микроскопического анализа.

#### *Иммуногистохимическое исследование.*

В качестве первичных использовали поликлональные антитела к интерлейкину-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ; ThermoFisher, 1:100, США), интерлейкину-6 (IL-6; ThermoFisher, 1:100, США), интерлейкину-10 (IL-10; ThermoFisher, 1:100, США), интерлейкину-4 (IL-4; ThermoFisher, 1:100, США). Для идентификации вторичных антител использовали универсальную двухкомпонентную систему HiDef Detection<sup>TM</sup> HRP Polymer («Cell Marque», США), включающую анти-IGG мыши/кролика, пероксидазу хрена (HRP) и DAB-субстрат. Для дополнительного окрашивания ядер клеток применяли гематоксилин Майера.

#### *Морфометрическое исследование.*

Для количественной оценки было исследовано 40 случайно выбранных сосудистых клубочков в поле зрения при увеличении  $\times 200$  с помощью программы Software DP-SOFT.

#### *Статистический анализ.*

Все статистические анализы проводились с использованием программы SPSS 12.0 for Windows (IBM Analytics, США). Все данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение. Тест Колмогорова-Смирнова использовался для проверки нормальности распределения данных каждой выборки. Для статистического анализа данных использовались различные подходы

в зависимости от характера распределения. При нормальном распределении для сравнения двух групп применялся Student-test (t-тест Стьюдента). В случаях, когда требовалось сравнить более двух групп, использовался однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA), за которым следовал post-hoc тест Тьюки для выявления значимых различий между группами. Если распределение данных отличалось от нормального, применялись непараметрические методы: для сравнения двух групп использовался тест Манна-Уитни, а для анализа более чем двух групп - тест Крускала-Уоллиса с последующим post-hoc тестом Данна. Различия считались статистически значимыми при уровне значимости  $p < 0.05$  (данный уровень значимости был выбран до начала проведения исследования).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Анализ биомаркеров воспаления.

У животных II-ой и III-ей групп (РОД 2 Гр и 8 Гр) в крови фиксировали увеличение цитокина IL-1 $\beta$  по сравнению с группой контроля. Это изменение было особенно сильно в III-ей группе (в 3,2 раза,  $p=0.034$ ) (рис. 1). В тоже время введение аскорбиновой кислоты до начала облучения животным IV-ой и V-ой групп (РОД 2 Гр + АК, РОД 8 Гр + АК) статистически снижало уровень цитокинов относительно групп моно-облучения ( $p=0.0087$ ;  $p=0.0092$ ) (рис. 1). В VI-ой группе (моно-введение АК; доза 50 мг/кг) не было выявлено статистических различий относительно группы контроля ( $p > 0.05$ ) (рис. 1).

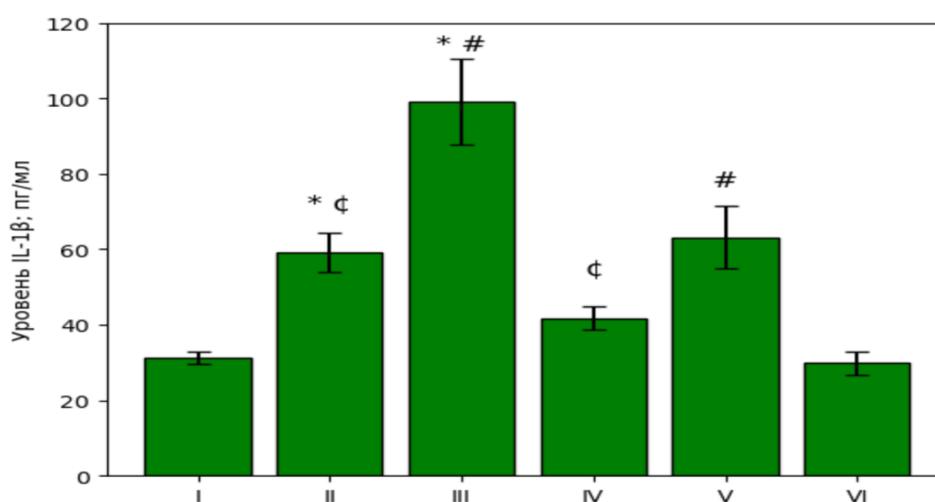


Рис. 1. Уровень IL-1 $\beta$  в крови на 7 сутки эксперимента. Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартного отклонения. Экспериментальные группы пронумерованы согласно дизайну эксперимента. Условные обозначения: статистически значимые различия по сравнению с контролем – \* ( $p < 0.05$ ); статистически значимые различия между II-ой и IV-ой – ϕ ( $p=0.0087$ ); различия между III-ей и V-ой группами – # ( $p=0.0092$ ).

Fig. 1. IL-1 $\beta$  levels in the blood on the 7th day of the experiment. Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation. The experimental groups are numbered according to the experimental design. Legend: Statistically significant differences compared to the control group are indicated by \* ( $p < 0.05$ ); statistically significant differences between Group II and Group IV are indicated by ϕ ( $p=0.0087$ ); differences between Group III and Group V are indicated by # ( $p=0.0092$ ).

Уровень IL-6 в крови животных II-ой и III-ей групп был статистически значимо увеличен по сравнению с контролем – в 2,6 раза ( $p=0.02300$ ) и 2,9 раза ( $p=0.0171$ ) соответственно (рис. 2). Предлучевое введение аскорбиновой кислоты животным IV-ой и V-ой групп (РОД 2 Гр + АК, РОД 8 Гр + АК) статистически значимо снижало уровень цитокинов относительно групп моно-облучения ( $p=0.0431$  и  $p=0.0082$ ) (рис. 2). В VI-ой группе (моно-введение АК; доза 50 мг/кг) не было выявлено статистических различий относительно группы контроля ( $p > 0.05$ ) (рис. 2).

При определении концентрации фактора некроза опухоли альфа (TNF- $\alpha$ ) в крови обнаружили

увеличение уровня цитокина в группах моно-облучения по сравнению с группой контроля (в 3,1 ( $p=0.019$ ) для II-ой группы и 5,3 ( $p=0.0281$ ) раза для III-ей группы, соответственно) (рис. 3). При этом предлучевое введение аскорбиновой кислоты в IV-ой и V-ой группах, статистически значимо снижало уровень TNF- $\alpha$  относительно групп облучения ( $p=0.00631$ ,  $p=0.0092$ ) (рис. 3). В группе моно-введения аскорбиновой кислоты (доза 50 мг/кг) не было выявлено статистических различий относительно группы контроля ( $p > 0.05$ ) (рис. 3).

### Оценка апоптотической активности.

В ходе исследования была проведена оценка маркеров апоптоза в гомогенате почечной ткани

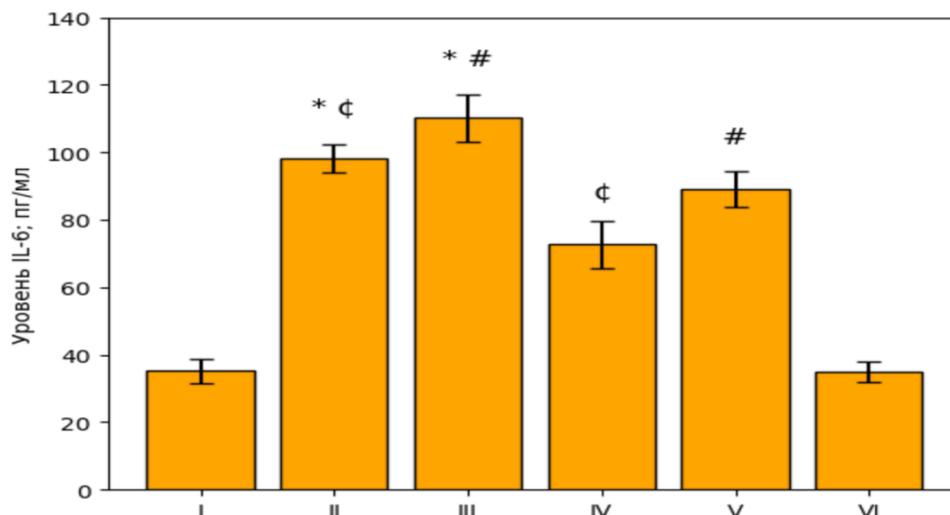


Рис. 2. Уровень IL-6 в крови на 7-е сутки эксперимента. Данные представлены в виде среднего значения±стандартного отклонения. Экспериментальные группы пронумерованы согласно дизайну эксперимента. Условные обозначения: статистически значимые различия по сравнению с контролем – \* ( $p<0.05$ ); статистически значимые различия между II-ой и IV-ой – ϕ ( $p=0.0431$ ); различия между III-ей и V-ой группами – # ( $p=0.0082$ ).

Fig. 2. IL-6 levels in blood on the 7th day of the experiment. Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation. The experimental groups are numbered according to the experimental design. Legend: Statistically significant differences compared to the control group are indicated by \* ( $p<0.05$ ); statistically significant differences between Group II and Group IV are indicated by ϕ ( $p=0.0431$ ); differences between Group III and Group V are indicated by # ( $p=0.0082$ ).

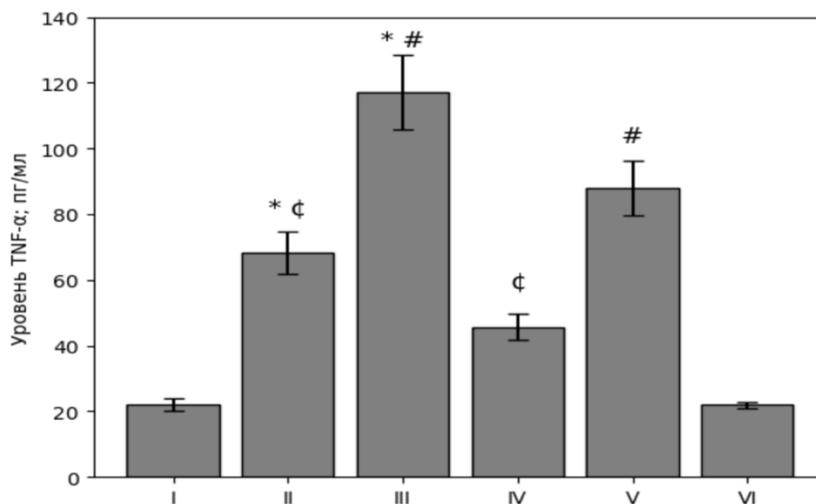


Рис. 3. Уровень TNF-α в крови на 7-е сутки эксперимента. Данные представлены в виде среднего значения±стандартного отклонения. Экспериментальные группы пронумерованы согласно дизайну эксперимента. Условные обозначения: статистически значимые различия по сравнению с контрольной группой обозначены – \* ( $p<0.05$ ); статистически значимые различия между II-ой и IV-ой – ϕ ( $p=0.00631$ ); различия между III-ей и V-ой группами – # ( $p=0.0092$ ).

Fig. 3. TNF- $\alpha$  level in blood on the 7th day of the experiment. Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation. The experimental groups are numbered according to the experimental design. Legend: Statistically significant differences compared to the control group are indicated by \* ( $p<0.05$ ); statistically significant differences between Group II and Group IV are indicated by ϕ ( $p=0.00631$ ); differences between Group III and Group V are indicated by # ( $p=0.0092$ ).

животных всех групп. В II-ой и III-ей группах обнаружили увеличения уровня каспазы-3 (в 3,3 ( $p=0.012$ ) и 5,1 ( $p=0.019$ ) раза соответственно), а также уровня p-53 (в 1,4 ( $p=0.013$ ) и 1,9 раза ( $p=0.011$ ) соответственно) (табл. 2). В гомогенатах почек IV-ой и V-ой групп наблюдали незначительные изменения показателей каспазы-3,

p-53 относительно группы контроля, а также статистически значимый уровень снижения относительно групп моно-облучения ( $p<0.01$  ( $p=0.0018$ ,  $p=0.0013$ ;  $p=0.0012$ ,  $p=0.0020$ )) (табл. 2). В VI-ой группе не обнаружили достоверного изменения уровней каспазы-3, p-53 относительно контрольной группы (табл. 2).

**Таблица 2. Уровни каспазы-3 и p-53 в гомогенате почечной ткани**  
**Table 2. Levels of caspase-3 and p-53 in renal tissue homogenate**

Группа   Group	Каспаза-3, нг/мг Caspase-3, ng/mg	p-53, нг/г p-53, ng/g
Контроль   Control	1,8±0,3	19,1±1,2
Облучение (РОД) 2 Гр   IRe- 2 Gy	6,2±0,6a ap=0.012	28,5±0,7a ap=0.013
Облучение (РОД) 8 Гр   IRe- 8 Gy	9,3±0,9a ap=0.019	37,6±2,2a ap=0.011
Облучение (РОД) 2 Гр + АК   IRe- 2 Gy + AA	4,4±0,7b bp=0.0018	23,0±1,3b bp=0.0012
Облучение (РОД) 8 Гр + АК   IRe- 8 Gy + AA	6,8±0,8b bp=0.0013	32,4±1,9b bp=0.0020
АК   AA	1,5±0,2	18,6±0,9

**Примечания:** статистически значимые различия с контролем обозначены: Облучение (a)  $p<0.05$ ; между группами облучения и облучение + АК (b);  $p<0.01$ .

**Notation:** statistically significant differences with control are indicated: Irradiation (a)  $p<0.05$ ; between irradiation and irradiation + AA groups (b);  $p<0.01$ .

#### *Гистологическое исследование.*

При гистологическом исследовании почек, полученных от животных I-ой и VI-ой групп, структуры органа сохраняли нормальную гистоархитектонику. Так, в корковом слое почек четко определялись почечные тельца с интактными капиллярными клубочками, а также проксимальные и дистальные отделы канальцев нефрона. В мозговом веществе наблюдались соответствующие отделы канальцев, не проявляющие признаков патологических изменений (рис. 4).

В образцах, полученных от животных II-ой и III-ей групп, были выявлены значительные патологические изменения: изменение капсулы Боумена (расширение); в корковом веществе фиксировали вакуолизацию и атрофию некоторых канальцев нефрона. Кроме того, фиксировали диссоциацию клеток в области macula densa, выраженный периваскулярный и парагломерулярный отек, дистрофические изменения и воспалительная инфильтрация интерстициальной ткани. Эти изменения были особенно выражены в III-ей группе, что свидетельствует о высокой степени повреждения тканей под действием более высоких доз облучения.

При предлучевом введении аскорбиновой кислоты животным IV-ой и V-ой групп (РОД 2 Гр +

АК, РОД 8 Гр + АК) патоморфологические изменения были менее выраженные по сравнению с образцами почек групп моно-облучения (рис. 4).

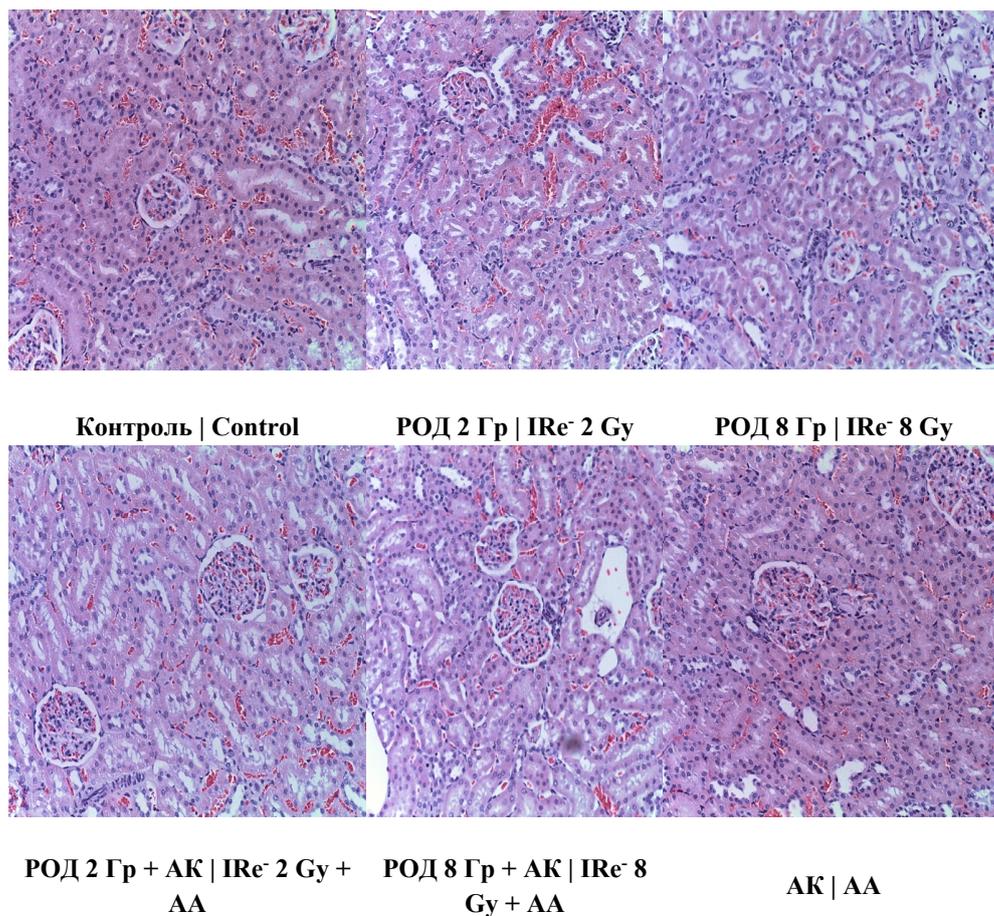
#### *Иммуногистохимическое исследование.*

При иммуногистохимической оценке распределения про- (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) и противовоспалительных (IL-4, IL-10) цитокинов в сосудистых клубочках и эпителии канальцев нефронов выявили количественные изменения в зависимости от группы, а также вида цитокинов. Особенностью является наличие слабо коричневой цитоплазмы и коричнево-желтой окраски ядер (рис. 5, 7).

При иммуногистохимической оценке микропрепаратов почек II-ой и III-ей (РОД 2 Гр и 8 Гр) групп обнаружили увеличение количества клеток, окрашенных на антитела к IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , преимущественно эндотелия сосудистых клубочков и незначительное в канальцах проксимального и дистального отделов нефрона как и наружного листка капсулы Боумена.

Количество окрашенных на провоспалительные цитокины эпителиоцитов петли Генле и собирательных трубочек не было статистически значимо ( $p=0.33$ ) (рис. 5).

В IV-ой и V-ой группах исследования наблюдалось значительное снижение уровня экспрес-



**Рис. 4. Почки контрольной и опытных групп. Окрашивание гематоксилином и эозином, увелич.  $\times 200$ .  
Fig. 4. Kidneys of control and experimental groups. Hematoxylin and eosin staining, magnific.  $\times 200$ .**

сии маркеров воспаления, таких как IL-1 $\beta$ , IL-6 и TNF- $\alpha$ , в эндотелиальных клетках сосудистых клубочков и эпителии канальцев нефрона. В количественном выражении, показатели воспалительной активности в этих группах были существенно ниже по сравнению с II и III группами ( $p < 0.05$  и  $p < 0.01$  соответственно), что свидетельствует о потенциальном протективном эффекте аскорбиновой кислоты в предотвращении радиационно-индуцированного воспаления (см. рис. 6).

В VI-ой группе (монотерапия аскорбиновой кислотой) изменения в экспрессии IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  не были статистически выраженными по сравнению с контролем (рис. 6).

При иммуногистохимическом исследовании микропрепаратов почек всех групп выявили определенный феномен распределения количества провоспалительных цитокинов: выраженную экспрессию на IL-10, IL-4 демонстрировал эндотелий сосудистых клубочков и большинство иммунокомпетентных клеток интерстициальной ткани преимущественно коркового вещества; в то же время эпителий канальцев проксимальных и дистальных отделов нефронов был иммунонегативный. Количество позитивных иммунокомпе-

тентных клеток увеличивалось в образцах почек групп предлучевого введения аскорбиновой кислоты ( $p < 0.01$  ( $p = 0.0013$ ,  $p = 0.0041$ )). В микропрепаратах почек групп моно-облучения обнаружили увеличение доли IL-10- и IL-4-позитивных эндотелиоцитов сосудистых клубочков по сравнению с контрольными значениями ( $p < 0.05$  ( $p = 0.012$ ,  $p = 0.0271$ )). Процентное содержание этих клеток возрастало при предлучевом введении аскорбиновой кислоты.

Между группами моно-введения аскорбиновой кислоты и контроля не выявили статистических различий распределения IL-4, IL-10 позитивных клеток ( $p > 0.05$ ) (рис. 7, рис. 8).

После облучения электронами по результатам серологического и иммуногистохимического исследований выявили увеличение провоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) и маркеров апоптоза, концентрация которых статистически снижалась при предлучевом введении аскорбиновой кислоты.

Таким образом, предлучевое введение аскорбиновой кислоты снижает степень выраженности патоморфологических изменений после воздействия электронами. Вероятно, АК ингибирует

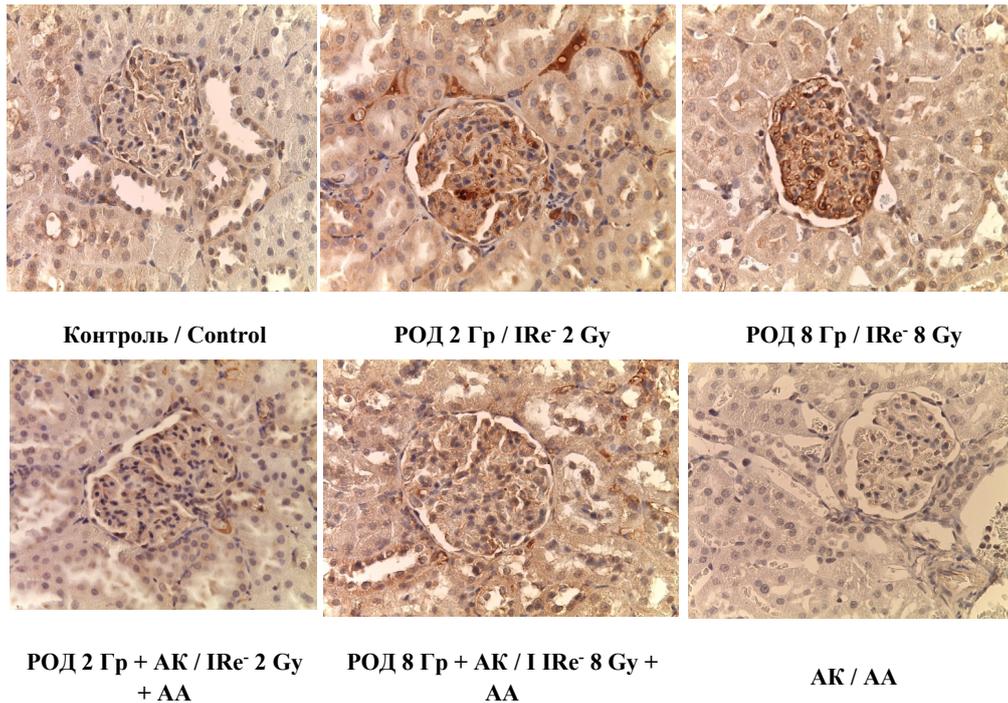


Рис. 5. Почки контрольной и опытных групп. Иммуногистохимическое исследование с антителами к IL-1β, докрасивание ядер гематоксилином, увелич. × 400.  
 Fig. 5. Kidney tissues. Immunohistochemical analysis using IL-1β antibodies, nuclei stained with hematoxylin, magnific. × 400.

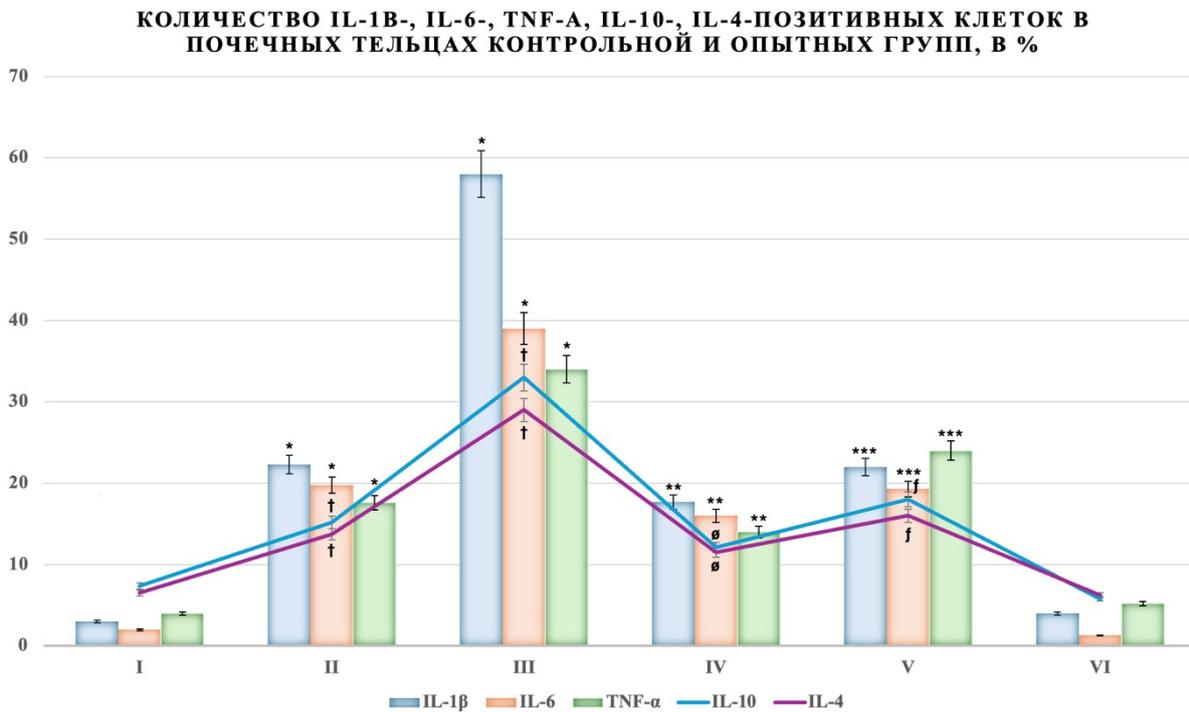
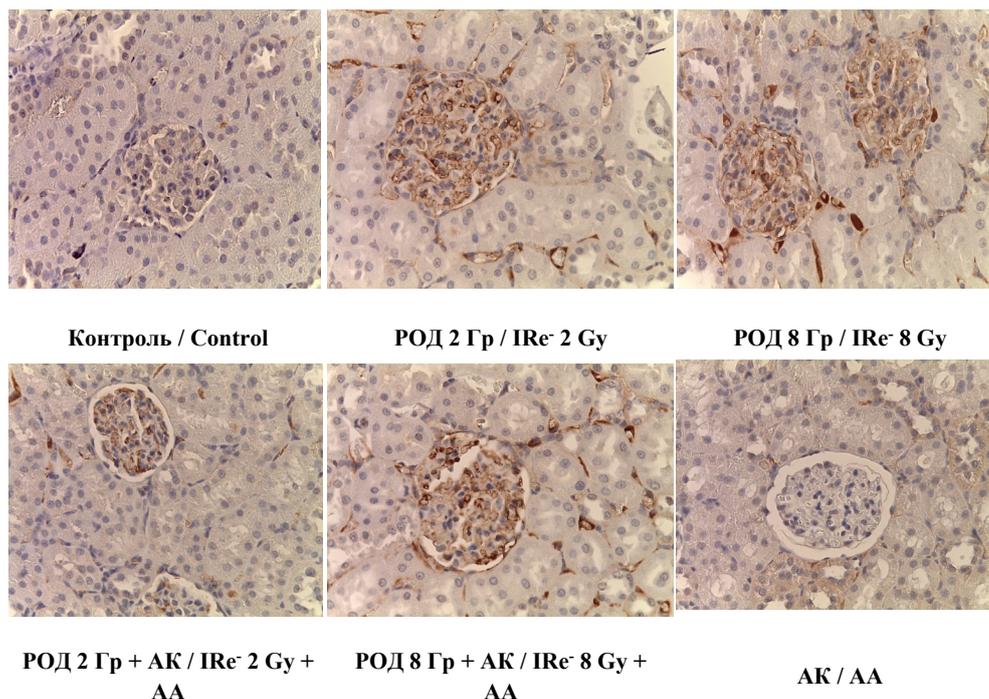


Рис. 6. Процентное содержание IL-1β-, IL-6-, TNF-α-, IL-10, IL-4-позитивных клеток в почечных тельцах. Экспериментальные группы пронумерованы согласно дизайну эксперимента. Условные обозначения: статистически значимые различия по сравнению с контролем – \*; † (p<0.05); различия между II-ой и IV-ой – \*\* (p<0.05), θ (p<0.05); различия между III-ей и V-ой группами – \*\*\* (p<0.01), f (p<0.01).  
 Fig. 6. Percentage of IL-1β-, IL-6-, TNF-α-, IL-10-, and IL-4-positive cells in renal glomeruli. The experimental groups are numbered according to the experimental design. Legend: statistically significant differences compared to control – \*; † (p<0.05); differences between the second and fourth groups – \*\* (p<0.05), θ (p<0.05); differences between the third and fifth groups – \*\*\* (p<0.01), f (p<0.01).



**Рис. 7. Почки контрольной и опытных групп. Иммуногистохимическое исследование с антителами на IL-10, докрасивание ядер гематоксилином, увелич.  $\times 400$ .**  
**Fig. 7. Kidney tissues. Immunohistochemical analysis using IL-10 antibodies, nuclei stained with hematoxylin, magnific.  $\times 400$ .**

маркеры оксидативного стресса, снижает характер местной воспалительной реакции, инактивирует экспрессию клеточных сигнальных путей, моделируя апоптотический каскад.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Настоящее исследование посвящено оценке регуляции уровня воспалительных цитокинов после предлучевого введения аскорбиновой кислоты в экспериментальной модели нефропатии, индуцированной электронным облучением.

Высокие дозы ионизирующего излучения (ИИ) способны активировать механизмы ингибирования клеточного цикла, приводящая к повреждениям ДНК и развитие оксидативного стресса [14]. В то же время, при анализе тканей почек и головного мозга, подвергшихся воздействию ИИ, выявили разную степень экспрессии генов, что опровергает предположение о единообразии генетических изменений в клетках [15]. Скорее всего изначально происходит индукция разных белков-регуляторов мембранных структур с последующей активацией разнородных сигнальных путей. Более того, было обнаружено, что инфракрасное излучение в фракционном режиме в высоких дозах способно вызывать аутоиммунные заболевания у мышей, что указывает на вовлечения компонентов иммунной системы, в част-

ности Т-клеток, в развитии радиационно-индуцированной токсичности [16].

Влияние электронов в РОД 2 Гр и РОД 8 Гр на почку приводит к повышению концентрации провоспалительных цитокинов в кровотоке, а также увеличению их количества в структурах почек. В медицинской литературе имеются релевантные данные, описывающие примеры активации других сигнальных молекул, включая IFN, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-18 и др., в первые сутки после облучения, однако в этом исследовании использовали не  $\beta$ -излучение [17].

Подавление факторов воспаления и запуск сигнальных путей снижает степень повреждение здоровых тканей. Это может быть одним из эффективных условий, снижающих негативное радиационное действие [18].

Воздействие электронов на почечную ткань приводит к выбросу большого количества РФК – индукторов оксидативного стресса, активаторов апоптоза и фрагментации ДНК [19]. Подтверждением активации апоптоза в тканях почки является обнаруженное увеличение уровней каспаза-3 и p-53.

Выбор маркера p-53 в нашем исследовании связан с хорошо изученными его свойствами: повышенная чувствительность к повреждениям ДНК, а также к окислительному стрессу [20]. Одной из наиболее важных ролей p53 является

его способность активировать транскрипционно-зависимый/независимый пути апоптоза [21]. Обнаруженное нами увеличение каспаза-3 и p53 в гомогенате почки совпадает с данными других авторов, где наблюдали активацию апоптоза за счет модуляции Ras/Raf/MEK-1 сигнальных путей и индукции белка p53 [22].

Кроме того, радиационно-индуцированные эффекты могут возникать и в необлученных клетках – явление, известное как эффект «стороннего наблюдателя», который включает в себя гибель, индукцию мутаций и неопластическую трансформацию [23].

Взаимодействие между мРНК и их генами-мишенями играет решающую роль в модуляции путей, реагирующих на радиационное воздействие [24]. При анализе иммунокомпетентных клеток после облучения отмечали изменения экспрессии мРНК и миРНК: вначале связанные с p53- и апоптотическими сигнальными путями, а затем с широким спектром клеточных процессов.

Применение ИИ остается краеугольным камнем лучевой терапии ЗНО, его цитотоксическое действие на здоровые ткани вызывает определенную настороженность у радиобиологов и онкологов. Уменьшение рисков воздействия электронов на клетку, обусловленные генетическими перестройками, появление воспалительных реакций, вовлечение иммунокомпетентных клеток актуализирует поиск лекарственных препаратов, обладающих протективными свойствами.

Принято считать, что аскорбиновая кислота способна восстанавливать разрывы ДНК, а также снижать токсическое действие различных форм радиации [25].

Известно, что аскорбиновая кислота подавляет радиационно-индуцированное старение в клетках фибробластического ряда у млекопитающих, нивелируя отсроченный окислительный стресс и ингибируя накопление p53 [26]. Эти исследования в совокупности подчеркивают потенциал аскорбиновой кислоты как радиопротекторного препарата.

В настоящем исследовании предлучевое введение аскорбиновой кислоты способствовало уменьшению степени выраженности патоморфологических изменений почек, прежде всего воспалительной реакции. Так, при изучении протекторных свойств натуральных антиоксидантов, в частности экстракта водорослей *Amphora*, другими учеными были описаны похожие результаты [27].

При количественной оценке маркеров воспаления в крови фиксировали разницу между группами монооблучением (РОД 2 Гр и РОД 8 Гр) и предлучевого введения аскорбиновой кислоты

(РОД 2 Гр + АК, РОД 8 Гр + АК), что также является косвенным доказательством о протективном действии аскорбиновой кислоты.

Важно отметить, что эффективность аскорбиновой кислоты не ограничивается лишь местным влиянием. Оно также включает системное действие на воспалительный процесс. Это связано с активацией иммунокомпетентных клеток в ответ на облучение электронами. Возможно, аскорбиновая кислота способствует снижению радиационно-индуцированной воспалительной реакции не только за счет непосредственного антиоксидантного действия, но и через регуляцию клеточных и молекулярных механизмов иммунного ответа, что частично совпадает с данными других исследователей [28].

Таким образом, согласно полученным данным, предлучевое введение аскорбиновой кислоты способствует снижению экспрессии провоспалительных цитокинов и ингибированию апоптоза, что в совокупности приводит к нивелированию радиационного повреждения почки. Эти результаты подчеркивают потенциал использования аскорбиновой кислоты в качестве одного из эффективных средств для профилактики ранней или поздней лучевой нефропатии.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предлучевое введение аскорбиновой кислоты в модели острой лучевой нефропатии (РОД 2 Гр и РОД 8 Гр) приводит к снижению уровня провоспалительных цитокинов в крови и в структурах почки, что также сопровождается модуляцией терминальной стадии апоптоза. Полученные данные серологического и молекулярно-биологического исследований не исключают радиопротективное действие аскорбиновой кислоты на структуры почки при облучении электронами.

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

**Conflicts of interest.** The authors have no conflicts of interest to declare.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Paithankar J. G., Gupta S. C., Sharma A. Therapeutic potential of low dose ionizing radiation against cancer, dementia, and diabetes: evidence from epidemiological, clinical, and preclinical studies. *Molecular Biology Reports*. 2023;50(3):2823-2834. doi:10.1007/s11033-022-08211-5.
2. Wild C. P., Espina C., Bauld L., Bonanni B., Brenner H., Brown K., Dillner J., Forman D., Kampman E., Nilbert M., Steindorf K., Storm H., Vineis P., Baumann M., Schüz J. *Cancer Prevention Europe*. *Molecular Oncology*. 2019;13(3):528-534. doi:10.1002/1878-0261.12455.

3. Kc S., Abolfath R. Towards the ionizing radiation induced bond dissociation mechanism in oxygen, water, guanine, and DNA fragmentation: a density functional theory simulation. *Scientific Reports*. 2022;12(1):19853. doi:10.1038/s41598-022-23727-3.
4. Diegeler S., Hellweg C. E. Intercellular Communication of Tumor Cells and Immune Cells after Exposure to Different Ionizing Radiation Qualities. *Frontiers in Immunology*. 2017;8:664. doi:10.3389/fimmu.2017.00664.
5. Alkis H., Demir E., Taysi M. R., Sagir S., Taysi S. Effects of *Nigella sativa* oil and thymoquinone on radiation-induced oxidative stress in kidney tissue of rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2021;139:111540. doi:10.1016/j.biopha.2021.111540.
6. Toledo Mauriño J. J., Fonseca-Camarillo G., Furuzawa-Carballeda J., Barreto-Zuñiga R., Martínez Benítez B., Granados J., Yamamoto-Furusho J. K. TRPV Subfamily (TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPV5, and TRPV6) Gene and Protein Expression in Patients with Ulcerative Colitis. *Journal of Immunology Research*. 2020;2020:2906845. doi:10.1155/2020/2906845.
7. Xiong X., Hu Y., Pan B., et al. RFRP-3 Influences Apoptosis and Steroidogenesis of Yak Cumulus Cells and Compromises Oocyte Meiotic Maturation and Subsequent Developmental Competence. *Int J Mol Sci*. 2023;24(8):7000. doi:10.3390/ijms24087000.
8. Farhood B., Mortezaee K., Goradel N. H., Khanlarkhani N., Salehi E., Nashtaei M. S., Najafi M., Sahebkar A. Curcumin as an Anti-Inflammatory Agent: Implications to Radiotherapy and Chemotherapy. *Journal of Cellular Physiology*. 2019;234:5728–5740. doi:10.1002/jcp.27442.
9. Zhang Y., Huang Y., Li Z., Wu H., Zou B., Xu Y. Exploring Natural Products as Radioprotective Agents for Cancer Therapy: Mechanisms, Challenges, and Opportunities. *Cancers (Basel)*. 2023;15(14):3585. doi:10.3390/c.2023.15(14):3585.
10. Rai G., Mahobiya P. Ameliorative effect of curcumin and ascorbic acid against ultraviolet B radiation-induced thyroid toxicity in female Wistar rats: A haematological and biochemical study. *Journal of Applied and Natural Science*. 2022. doi:10.31018/jans.v14i1.3321.
11. Kennedy E. E., Li C., Delaney S. Global Repair Profile of Human Alkyladenine DNA Glycosylase on Nucleosomes Reveals DNA Packaging Effects. *ACS Chemical Biology*. 2019;14(8):1687-1692. doi:10.1021/acscmbio.9b00263.
12. Demyashkin G. A., Koryakin S. N., Stepanova Y. Y., Shchekin V. I., Shegai P. V. Morphological characterization of kidneys in rats after targeted irradiation with electrons at doses of 2, 4 and 6 G. *Veterinary Physician*. 2021;9-16. doi:10.33632/1998-698X.2021-5-9-16.
13. Mironov A. N., ed. Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. CH. I, II. Moscow: Grif and K, 2013.
14. Dos Santos A. F., Prado F. C. R., de Paula Novaes C., de Magalhães A. C., Deboni M. C. Z., Corrêa L. Simultaneous irradiation of 660 and 808 nm on gingival epithelial cells and fibroblasts induces different patterns of oxidative/antioxidative activities: What is the role of the cell type and irradiation parameters? *Photochem Photobiol*. 2023 Nov 27. doi:10.1111/php.13886.
15. Zhao W., Chuang E. Y., Mishra M., et al. Distinct effects of ionizing radiation on in vivo murine kidney and brain normal tissue gene expression. *Clin Cancer Res*. 2006;12(12):3823-3830. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-2418.
16. Sakaguchi N., Miyai K., & Sakaguchi S. Ionizing radiation and autoimmunity. Induction of autoimmune disease in mice by high dose fractionated total lymphoid irradiation and its prevention by inoculating normal T cells. *Journal of immunology*. 1992;152(5):2586-95. doi:10.4049/jimmunol.152.5.2586.
17. Bahrayni Toosi M. T., Kasiri A., Torabinejad S., Soleymanifard S., Sankian M., Aledavood S. A., Hosseini Shamili F., Lavi F. Preliminary Results of the Effects of Localized High-Dose Radiotherapy Combined with Total Body Low-Dose Irradiation on Tumor Growth and Stimulating the Immune System in Tumor-Bearing Mice. *J Biomed Phys Eng*. 2023;13(4):323-332. doi:10.31661/jbpe.v0i0.2009-1179.
18. Zhang Y., Huang Y., Li Z., Wu H., Zou B., Xu Y. Exploring Natural Products as Radioprotective Agents for Cancer Therapy: Mechanisms, Challenges, and Opportunities. *Cancers (Basel)*. 2023;15(14):3585. doi:10.3390/cancers15143585.
19. Yumusak N., Sadic M., Yucel G., Atilgan H. I., Koca G., Korkmaz M. Apoptosis and cell proliferation in short-term and long-term effects of radioiodine-131-induced kidney damage: an experimental and immunohistochemical study. *Nucl Med Commun*. 2018;39(2):131-139. doi:10.1097/MNM.0000000000000788.
20. Potapova T, Gorbysky GJ. The Consequences of Chromosome Segregation Errors in Mitosis and Meiosis. *Biology (Basel)*. 2017;6(1):12. doi:10.3390/biology6010012.
21. Goldar S., Khaniani M. S., Derakhshan S. M., Baradaran B. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(6):2129-44. doi:10.7314/apjcp.2015.16.6.2129
22. Lee A. H., Ghosh D., Koh I. L., Dawson M. R. Senescence-associated exosomes transfer

- miRNA-induced fibrosis to neighboring cells. *Aging (Albany NY)*. 2023;15(5):1237-1256. doi:10.18632/aging.204539.
23. Li X., Seymour C. B., Mothersill C., Rollo C. D. Investigation of presence and impact of radiation-induced bystander effect in *Acheta domesticus*. *Int J Radiat Biol*. 2023;99(10):1619-1630. doi:10.1080/09553002.2023.2188977.
24. Ruyscher D., Niedermann G., Burnet N., Siva S., Lee A., & Hegi-Johnson F. Radiotherapy toxicity. *Nature Reviews Disease Primers*. 2019;5:1-20. doi:10.1038/s41572-019-0064-5.
25. Alexander M. S., Wilkes J. G., Schroeder S. R., Buettner G. R., Wagner B. A., Du J., Gibson-Corley K., O'Leary B. R., Spitz D. R., Buatti J. M., Berg D. J., Bodeker K. L., Vollstedt S., Brown H. A., Allen B. G., Cullen J. J. Pharmacologic Ascorbate Reduces Radiation-Induced Normal Tissue Toxicity and Enhances Tumor Radiosensitization in Pancreatic Cancer. *Cancer Res*. 2018;78(24):6838-6851. doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-1680.
26. González E., Cruces M., Pimentel E., & Sanchez P. Evidence that the radioprotector effect of ascorbic acid depends on the radiation dose rate. *Environmental toxicology and pharmacology*. 2018;(2):210-214. doi:10.1016/j.etap.2018.07.015.
27. El-Sonbaty S. M., Moawed F. S. M., Elbakry M. M. M. Amphora algae with low-level ionizing radiation exposure ameliorate D-galactosamine-induced inflammatory impairment in rat kidney. *Environ Toxicol*. 2021;36(4):451-459. doi:10.1002/tox.23050.
28. Qi T., Sun M., Zhang C., Chen P., Xiao C., Chang X. Ascorbic Acid Promotes Plasma Cell Differentiation through Enhancing TET2/3-Mediated DNA Demethylation. *Cell Reports*. 2020;33(9):108452. doi:10.1016/j.celrep.2020.108452.

УДК: 616.831.31-005.4.-092.913:618.33

DOI: 10.29039/2224-6444-2024-14-2-39-46

## ФЕТАЛЬНЫЙ ГЕМОГЛОБИН И НЕЙРОГЛОБИН В КРОВИ ПАЦИЕНТОВ ПОСЛЕ РЕКОНСТРУКТИВНЫХ ОПЕРАЦИЙ НА СОННЫХ АРТЕРИЯХ

**Коханов А. В., Бисалиева Р. А., Эбзеева Л. Х.**

Кафедра фундаментальной химии, ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет Минздрава России», 414000, улица Бакинская, 121, Астрахань, Россия

Для корреспонденции: Коханов Александр Владимирович, доктор медицинских наук, профессор кафедры фундаментальной химии ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет Минздрава России», e-mail: kokhanov@mail.ru

For correspondence: Alexander V. Kokhanov, MD, professor of Department of Fundamental Chemistry of the Astrakhan State Medical University, e-mail: kokhanov@mail.ru

### Information about authors:

**Kokhanov A. V.**, <http://orcid.org/0000-0002-4167-6299>**Bisalieva R. A.**, <https://orcid.org/0009-0003-9814-5098>**Ebzeeva L. Kh.**, <https://orcid.org/0009-0009-1432-7147>

### РЕЗЮМЕ

Дыхательный пигмент гемоглобин (Hb) с биохимических позиций – это четыре полипептидные цепи, каждая из которых содержит гем (Fe-протопорфирин IX). К наиболее значимым и изученным гемоглобинам человека относятся: HbA1, HbA2, фетальный гемоглобин (HbF) и открытый 20 лет назад нейроглобин (Ngb), мономолекулярный пептид, аналогичный по строению миоглобину (Mb) мышц человека. Выполняющие в крови транспортную функцию тетрамерные гемоглобины в клинической практике чаще всего использовали в качестве маркеров гипоксии или показателей гематологических заболеваний. Учитывая низкую концентрацию нейроглобина в тканях мозга, сетчатки, эндокринных желез человека возникло предположение об особой роли (Ngb) в ЦНС. Целью данной работы было улучшение результатов диагностики и лечения пожилых пациентов с атеросклеротическим стенозом внутренних сонных артерий (ВСА) после операции – каротидной эндартерэктомии (КЭЭ) посредством применения новых биохимических тестов на фетальный гемоглобин и нейроглобин. Результаты. Сопоставление уровней фетального гемоглобина при поступлении и выписке выявило статистически достоверное снижение уровней фетального гемоглобина после операций КЭЭ до нормы в группах пациентов без и с ишемическим инсультом в анамнезе. Уровни нейроглобина у пациентов с атеросклеротической окклюзией сонных артерий, направленных на операцию каротидной эндартерэктомии, в сыворотке крови обнаружены в единичных случаях в пороговых концентрациях. Заключение. Однако в отличие от сывороток крови нами впервые обнаружены значимые концентрации нейроглобина в гемолизатах крови пациентов, перенесших острое нарушение мозгового кровообращения, что может иметь диагностическое и прогностическое значение.

**Ключевые слова:** пожилые пациенты, атеросклеротический стеноз сонных артерий, операция каротидной эндартерэктомии, ишемический инсульт в анамнезе, фетальный гемоглобин, нейроглобин, определение в гемолизате крови.

### FETAL HEMOGLOBIN AND NEUROGLOBIN IN THE BLOOD OF PATIENTS AFTER RECONSTRUCTIVE SURGERY ON THE CAROTID ARTERIES

**Kokhanov A. V., Bisalieva R. A., Ebzeeva L. Kh.**

Astrakhan State Medical University, Astrakhan, Russia

### SUMMARY

The respiratory pigment hemoglobin (Hb), from a biochemical standpoint, is four polypeptide chains, each of which contains heme (Fe-protoporphyrin IX). The most significant and studied human hemoglobins include: HbA1, HbA2, fetal hemoglobin (HbF) and neuroglobin (Ngb), a monomolecular peptide discovered 20 years ago, similar in structure to myoglobin (Mb) of human muscles. Carrying out the transport function in the blood, tetrameric hemoglobins in clinical practice were most often used as markers of hypoxia or indicators of hematological diseases. Given the low concentration of neuroglobin in the tissues of the brain, retina, and endocrine glands of humans, an assumption arose about the special role of (Ngb) in the central nervous system. The aim of this work was to improve the results of diagnosis and treatment of elderly patients with atherosclerotic stenosis of the internal carotid artery (ICA) after carotid endarterectomy (CEE) operations by using new biochemical tests for fetal hemoglobin and neuroglobin. Results. Comparison of fetal hemoglobin levels at admission and discharge revealed a statistically significant decrease in fetal hemoglobin levels after CEE operations to normal in groups of patients with and without a history of ischemic stroke. Neuroglobin levels in patients with atherosclerotic occlusion of carotid arteries, referred for carotid endarterectomy, in blood serum were detected in isolated cases in threshold concentrations. Conclusion. However, unlike blood serum, we have for the first time detected significant concentrations of neuroglobin in blood hemolysates of patients who have had stroke, which may have diagnostic and prognostic significance.

**Key words:** elderly patients, atherosclerotic stenosis of the carotid arteries, carotid endarterectomy surgery, history of ischemic stroke, fetal hemoglobin, neuroglobin, determination in blood hemolysate.

Дыхательный пигмент гемоглобин (Hb) с биохимических позиций – это четыре полипептидные цепи, каждая из которых содержит гем (Fe-протопорфирин IX). К наиболее значимым и изученным гемоглобинам человека относятся: HbA1, HbA2, фетальный гемоглобин (HbF) и открытый 20 лет назад нейроглобин (Ngb), мономолекулярный пептид, аналогичный по строению миоглобину (Mb) мышц человека [1; 2; 3]. Выполняющие в крови транспортную функцию тетрамерные гемоглобины в клинической практике чаще всего использовали в качестве маркеров гипоксии или показателей гематологических заболеваний [4; 5; 6]. Учитывая низкую концентрацию нейроглобина в тканях мозга, сетчатки, эндокринных желез человека возникло предположение об особой роли (Ngb) в ЦНС [7; 8; 9].

Доказано, что избыток нейроглобина облегчает последствия острых нарушений сердечного и мозгового кровообращения [10; 11; 12]. Что касается многочисленных исследований, посвященных HbF, проведенных в Астраханском ГМУ, были получены данные о значении фетального гемоглобина (HbF) в качестве маркеров гипоксии различного генеза при сердечно-сосудистых и гематологических заболеваниях [13-17].

Острое нарушение мозгового кровообращения (ОНМК), которое приводит к снижению качества жизни, и даже смерти пациентов, чаще всего возникает на фоне ишемического поражения головного мозга [18; 19]. Ведущей причиной инсульта у пациентов пожилого возраста является стенозирующее поражение внутренних сонных артерий атеросклеротическим процессом. Следует отметить, что атеросклеротические стенозы и окклюзии несравнимо чаще встречаются в бассейне церебральных артерий в сравнении с интракраниальными артериями [20; 21]. На сегодняшний день приоритетным методом лечения данной патологии являются различные хирургические операции. Наиболее частой операцией при стенозе сонных артерий является операция эверсионной каротидной эндартерэктомии [22; 23].

В последние годы разработано множество биохимических маркеров, в число которых входят нейроглобин (Ngb) и фетальный гемоглобин (HbF), которые могли бы найти применение как у пациентов с церебральным инсультом, даже в остром периоде, так и у пациентов со стенозом каротидных артерий без ОНМК в анамнезе, направленных на операцию КЭЭ [4; 12; 16].

Целью данной работы было улучшение результатов диагностики и лечения пожилых пациентов с атеросклеротическим стенозом внутренних сонных артерий (ВСА) после операции каротидной эндартерэктомии (КЭЭ) посредством

применения новых биохимических тестов на фетальный гемоглобин и нейроглобин.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В группу пациентов вошло 63 человека в возрасте от 42 лет до 81 года, которым выполнена операция каротидной эндартерэктомии: 40 мужчин (63,5%), и 23 женщины (34,5%). Группа I – 46 пациентов первой группы после операции каротидной эндартерэктомии: 31 мужчина (67,4%) и 15 женщин (32,6%), не имевших ОНМК в анамнезе. Группа II – 17 пациентов второй группы после операции каротидной эндартерэктомии: 9 мужчин (52,9%) и 8 женщин (47,1%), перенесших ранее ОНМК. В III группу (группа контроля) – вошли 50 соматически здоровых лиц (доноры), медиана возраста составила 51,0 [45; 56] год. Группы сопоставимы по возрасту и полу.

На операцию направлялись пациенты со стенозом сонной артерии, более чем в 70%, или с более низким стенозом на фоне нестабильной атероматозной бляшки, что подтверждалось результатами дуплексного исследования. Все больные оперированы одной бригадой ангиохирургов. Операция каротидной эндартерэктомии выполнялась под общим наркозом.

Все обследованные пациенты помимо способа операции на сонной артерии подразделялись на подгруппы, не имеющих в анамнезе ОНМК и перенесших ишемический инсульт [7].

Клинические методы исследования: пульсоксиметрия, электрокардиография, УЗИ, дуплексное сканирование артерий шеи, транскраниальная доплерография, компьютерная томография головного мозга, ангиография сосудов головного мозга с контрастированием и магнитно-резонансная томография. Всем пациентам определяли степень неврологического дефицита по шкале NIHSS, а также по модифицированной шкале Рэнкина. Оценку неврологического статуса проводили как после ОНМК, так и непосредственно перед КЭЭ.

Лабораторные методы: общий анализ крови, общий анализ мочи, биохимическое исследование гемолитатов и сывороток крови, коагулограмма.

При невозможности экспресс-исследования на гематологическом анализаторе пробы с кровью с антикоагулянтом в стандартной концентрации: ЭДТА (1,5 мг/мл), цитратом натрия (3,8%) или гепарина (20 МЕ на мл) отмывали от примеси сывороточных белков путем центрифугирования, и отмывую эритроцитарную взвесь подвергали гемолизу путем добавления в пробирки сапонины (Merck, Германия) до конечной концентрации 0,01%.

Исследование всех собранных образцов гемолизированной и консервированной крови на

фетальный гемоглобина и белок нейроглобин производилось отсроченно в КДЛ Икрянинской ЦРБ (зав. лаб. С.В. Шининова), владеющей технологией исследования гемолизатов на фетальный гемоглобин.

На сегодняшний день в лаборатории Астраханского ГМУ разработаны схемы выделения и очистки нейроглобина из мозговой ткани человека, на полученные препараты получены моноспецифические антисыворотки и сконструированы тест-системы для иммунодиффузионного анализа (ИДА) нейроглобина. Тест-система на нейроглобин предоставлена доцентом кафедры биохимии Астраханского ГМУ Бисалиевой Р.А.

Проведение данной работы одобрена Этическим комитетом ФГБОУ ВО Астраханский ГМУ Минздрава России (протокол № 11 от 19.09.2023 г.).

Полученные нами значения активности нейроглобина и фетального гемоглобина представили в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (Q1 и Q3). Для сравнений различий между группами применялся непараметрический критерий U Манна–Уитни с уровнем значимости  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведено сравнение показателей гемограммы у пациентов с выраженным атеросклеротическим поражением сонных артерий, требующих проведения реконструктивной операции на сонных артериях у двух подгрупп пациентов: не имевших ОНМК в анамнезе (табл. 1; рис. 1) и пациентов с перенесенным ранее ишемическим инсультом (табл. 2; рис. 2).

Так как концентрация многих показателей красной крови связана с полом пациента, в таблицах 1 и 2 результаты представлены с учетом гендерных различий. Для биохимических исследований сыворотка крови и гемолизат эритроцитов забирались двукратно при поступлении пациента на операцию и при выписке.

Установлены достоверные различия по уровням эритроцитов между мужчинами и женщинами контрольной группы доноров, у пациентов, направленных на хирургическое лечение стеноза ВСА, достоверных различий по уровням эритроцитов связанных с полом не установлено (табл. 1 и табл. 2).

Установлены достоверные различия по уровням гемоглобина в зависимости от пола и у пациентов, направленных на операцию каротидной эндартерэктомии, не имевших в анамнезе ОНМК (табл. 1). У пациентов с ишемическим инсультом в анамнезе данная тенденция не наблюдается.

Уровни фетального гемоглобина при поступлении пациентов, направленных на операцию каротидной эндартерэктомии, имеющих и не имеющих в анамнезе ОНМК во всех случаях статистически достоверно отличались от контрольной

группы доноров соответствующего пола (табл. 1 и табл. 2).

Уровни фетального гемоглобина при выписке от контрольных значений доноров не отличались. Однако обнаружены статистически достоверные различия между подгруппами пациентов ( $p < 0,05$ ), направленных на каротидное стентирование, входящих в подгруппы имеющих и не имеющих в анамнезе ОНМК.

Сопоставление уровней фетального гемоглобина при поступлении и выписке выявило во всех восьми случаях (по 4 колонки в таблицах 1 и 2) статистически достоверное снижение уровней фетального гемоглобина после операций на сонной артерии до нормы.

Аналогичная ситуация наблюдается для отношения количества фетального гемоглобина к общему гемоглобину выраженное в процентах - отношение HbF/ HbA (%) при поступлении и выписке выявило во всех восьми случаях (по 4 колонки в таблицах 1 и 2) статистически достоверное снижение уровней фетального гемоглобина после операций на сонной артерии до нормы.

Для получения препарата нейроглобина человека мы использовали многоступенчатую систему выделения и очистки мозговой ткани. Полученная тест-система на нейроглобин не реагировала ни с сыворотками доноров, ни с сыворотками крови всех остальных обследованных пациентов. Однако нами установлено, что часть эритроцитов может реагировать с моноспецифической кроличьей антисывороткой, полученной против нейроглобина из мозга человека. Данный феномен нуждается в самостоятельном всестороннем изучении.

Что касается изучения уровней нейроглобина у пациентов с атеросклеротической окклюзией сонных артерий, направленных на операцию каротидной эндартерэктомии, то в их гемолизатах крови в отличие от донорских гемолизатов эритроцитов действительно обнаружены концентрации нейроглобина в десятки и сотни раз превосходящие концентрации Ngb в гемолизатах эритроцитов доноров (табл. 3).

Особенно высокие концентрации нейроглобина обнаружены в гемолизатах крови пациентов, перенесших ОНМК. Однако статистически значимых различий в концентрации нейроглобина между группам пациентов имевших и неимевших ОНМК в анамнезе нами не установлено из-за большого разброса результатов и низкой чувствительности разработанной нами тест-системы на нейроглобин. Уровни нейроглобина (в виде  $M \pm m$  и медианы) у обследованных пациентов, направленных на операцию каротидной эндартерэктомии, дифференцированно по подгруппам без ОНМК и с ишемическим инсультом в анамнезе, представлены в табл. 3.

**Таблица 1. Концентрации изученных показателей в гемолизатах крови у пациентов, направленных на операцию каротидной эндартерэктомии, не имевших ОНМК в анамнезе (данные в таблице представлены медианой и межквартильным размахом).**

**Table 1. Concentrations of the studied parameters in blood hemolysates in patients referred for carotid surgery who did not have a history of stroke (data in the table are presented as median and interquartile range).**

Показатели крови	Контроль (доноры)		операции КЭЭ	
	Муж (n=26)	Жен (n=24)	Муж (n=31)	Жен (n=15)
Эритроциты, $\times 10^{12}/\text{л}$	4,44 (4,31/4,73)	3,84 (3,63/4,10) p1<0,05	4,21 (3,74/4,43) p2<0,05	3,80 (3,53/4,13)
Гемоглобин, (г/л)	139 (131/158)	137 (130/143)	146 (133/155)	134 (128/142) p1<0,05
Цветной показатель	0,90 (0,82/0,96)	0,90 (0,84/0,95)	0,86 (0,82/0,97)	0,83 (0,80/0,90)
Фетальный HbF (г/л) перед опер	1,63 (1,34/2,52)	1,73 (1,18/2,21)	3,67 (3,33/4,69) p1<0,05	3,78 (3,22/4,11) p1<0,05
Фетальный HbF (г/л) при выписке	-	-	1,67 (1,33/2,69) p4<0,05	1,78 (1,22/2,11) p4<0,05
отношение HbF/ HbA(%) перед опер	1,14 (0,83/2,14)	1,30 (0,84/1,53)	2,68 (2,24/3,39) p1<0,05	2,82 (2,24/3,65) p1<0,05
отношение HbF/ HbA(%) при выписке	-	-	1,16 (0,91/1,97) p3<0,05	1,33 (0,98/2,08) p3<0,05

**Примечание:** p1 – значимость различий между показателями мужчин и женщин, p2 – значимость различий оперированных больных с группой доноров соответствующего пола, p3 – значимость различий между абсолютными и относительными уровнями HbF при поступлении и выписке.

**Note:** p1 – significance of differences between the indicators of men and women, p2 – significance of differences between operated patients and the donor group of the corresponding gender, p3 – significance of differences between absolute and relative HbF levels upon admission and discharge.

**Таблица 2. Концентрации изученных показателей в гемолизатах крови у пациентов, направленных на операцию каротидной эндартерэктомии, ранее перенесших ишемический инсульт (данные в таблице представлены медианой и межквартильным размахом).**

**Table 2. Concentrations of the studied parameters in blood hemolysates in patients referred for carotid endarterectomy surgery who had previously suffered an ischemic stroke (data in the table are presented as median and interquartile range).**

Показатели крови	Контроль (доноры)		Операции КЭЭ	
	Муж (n=26)	Жен (n=24)	Муж (n=9)	Жен (n=8)
Эритроциты, $\times 10^{12}/\text{л}$	4,44 (4,31/4,73)	3,84 (3,63/4,10)	4,28 (3,89/4,56) p2<0,05	4,18 (3,80/4,55)
Гемоглобин, (г/л)	139 (131/158)	137 (130/143)	138 (127/147)	138 (134/148)
Цветной показатель	0,90 (0,82/0,96)	0,90 (0,84/0,95)	0,82 (0,78/0,95)	0,82 (0,77/0,87)
Фетальный HbF (г/л) перед опер	1,63 (1,34/2,52)	1,73 (1,18/2,21)	3,67 (3,11/4,89) p1<0,05	3,78 (3,22/4,56) p1<0,05
Фетальный HbF (г/л) при выписке	-	-	1,67 (1,11/2,89)	2,44 (1,44/2,56)
отношение HbF/ HbA (%) перед опер	1,14 (0,83/2,14)	1,30 (0,84/1,53)	2,50 (2,21/3,29) p1<0,05	2,88 (2,51/3,45) p1<0,05
отношение HbF/ HbA (%) при выписке	-	-	1,06 (0,84/1,99) p3<0,05	1,65 (1,00/2,10) p3<0,05

**Примечание:** p1 – значимость различий между показателями мужчин и женщин, p2 – значимость различий оперированных больных с группой доноров соответствующего пола, p3 – значимость различий между абсолютными и относительными уровнями HbF при поступлении и выписке.

**Note:** p1 – significance of differences between the indicators of men and women, p2 – significance of differences between operated patients and the donor group of the corresponding gender, p3 – significance of differences between absolute and relative HbF levels upon admission and discharge.

**Таблица 3. Титры нейроглобина в гемолизатах крови доноров и пациентов, направленных на операцию каротидной эндартерэктомии, имеющих и не имеющих в анамнезе ОНМК (данные в таблице представлены ( $M \pm m$ , медианой и межквартильным размахом).**

**Table 3. Neuroglobin titers in blood hemolysates of donors and patients referred for carotid endarterectomy surgery, with and without a history of stroke (data in the table are presented ( $M \pm m$ , median and interquartile range).**

Биохимический маркер	Контроль	Операции КЭЭ	Операции КЭЭ
	(доноры)	ОНМК в анамнезе не указано	В анамнезе ишемический инсульт
	n=50	n=46	n=17
Нейроглобин эритроцитов (мкг/мл)	0,006±0,003 0,00 (0,00/0,00)	0,051±0,010 0,00 (0,00/0,10) p1<0,05	0,879±0,256 0,40 (0,20/0,80) p1<0,05 p2=0,165

**Примечание:** p1 – значимость различий оперированных больных с группой доноров, p2 – значимость различий между показателями у пациентов без и ОНМК в анамнезе.

**Note:** p1 – significance of differences between operated patients and the donor group, p2 – significance of differences between indicators in patients without and with a history of stroke.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Каротидная эндартерэктомия (КЭЭ) является «золотым стандартом» лечения атеросклеротических поражений сонных артерий [20; 23]. В статистике неврологических катастроф, обусловленных КЭЭ, на первый план выходят такие осложнения, как ишемия мозга, гиперперфузионный синдром, а также повреждение черепно-мозговых нервов [18; 21; 22].

В данной статье сделан упор на анализе исследований фетального гемоглобина и нейроглобина у пожилых пациентов с атеросклеротическим стенозом внутренней сонных артерии (ВСА) после операции каротидной эндартерэктомии (КЭЭ) путем сопоставления результатов в подгруппах пациентов, имеющих и не имеющих в анамнезе ОНМК [5; 7; 10].

Что касается фетального гемоглобина (HbF), то он является самым изученным минорным гемоглобином человека. В данной статье мы не заостряли внимания на физико-химических свойствах, методах очистки и выделения HbF и иммунохимических аспектах получения иммунохимических тест-систем на этот маркер [2; 4]. Кроме того, в последние годы активно изучается изменение продукции этого протеина при стресс-нормальных и патологических состояниях человека в самых разнообразных категориях населения [5; 16; 17].

Нами впервые налажено массовое определение фетального гемоглобина в гемолизатах эритроцитов крови. Определения HbF методом непрямого твердофазного иммуноферментного

анализа в гемолизатах крови апробированы на донорах и пациентах с различной патологией, сопровождающейся ишемией и гипоксией [6; 15].

Уровень HbF у пациентов с атеросклеротическим стенозом сонных артерий зависит от характера гипоксического поражения ЦНС. Установлено, что при гипоксически-ишемическом поражении ЦНС концентрации фетального гемоглобина в 1,5 раза превышает продукцию этого глобина у пациентов с гипоксически-геморрагическим поражением [2; 4; 16].

Что касается изучения уровней нейроглобина (Ngb) у пациентов с атеросклеротической окклюзией сонных артерий, направленных на операцию каротидной эндартерэктомии, то в их гемолизатах крови в отличие от донорских гемолизатов эритроцитов обнаружены концентрации нейроглобина в десятки и сотни раз превосходящие концентрации Ngb в гемолизатах эритроцитов доноров. Что касается нейроглобина, то тест на него обладает не только диагностическим потенциалом, но и существенным потенциалом практического применения в качестве основы для биомедицинских препаратов, действие которых направлено на ингибирование гибели нейрональных клеток. Подобные препараты могут быть чрезвычайно востребованы в качестве терапевтических средств как при патологических состояниях (нейродегенеративных заболеваниях, инсультах, ишемиях и гипоксиях различного генеза) [7; 9; 11].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено сравнение показателей гемограммы у пациентов с выраженным атеросклероти-

ческим поражением сонных артерий, требующих проведения реконструктивной операции на сонных артериях, у пациентов, не имевших ОНМК в анамнезе, и пациентов с перенесенным ранее ишемическим инсультом. Определены уровни фетального гемоглобина и нейроглобина в гемолизатах крови у пациентов после ревазуляризации церебральных артерий методом эверсионной каротидной эндалтерэктомии. Тесты на фетальный гемоглобин и нейроглобин отражают степень ишемического поражения головного мозга. Применение новых иммуноферментных тестов на фетальный гемоглобин и нейроглобин в гемолизатах крови у пациентов после ревазуляризации церебральных артерий может быть полезным для оценки качества проведенных операций на атеросклеротически пораженных сонных артериях.

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

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

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Юшков Б. Г., Черешнев В. А., Бриллиант С. А. Гетерогенная система гемоглобина и ее роль в норме и при патологии. Клиническая патофизиология. 2020;26(2):22-36.
2. Кривенцев Ю. А., Кривенцева Л. А. Гемоглобины человека как диагностические маркеры. Научное обозрение. Медицинские науки. 2018;1:16-20.
3. Burmester T., Gerlach F., Hankeln T. Regulation and role of neuroglobin and cytoglobin under hypoxia. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2007;618:169-180.
4. Никулина Д. М., Кривенцев Ю. А., Бисалиева Р. А., Лапеко С. В. Новый иммунохимический тест для лабораторной оценки состояния эритронов. Клиническая лабораторная диагностика. 2009; 12: 27-30.
5. Коханов А. В., Шининова С. В., Воронкова М. Ю., Бисалиева Р. А. Нормативные показатели красной крови у здоровых детей дошкольного возраста юга Астраханской области человека. Современные проблемы науки и образования. 2016;5. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=25205>. (Дата обращения: 12.03.2024).
6. Шининова С. В., Саташева З. М., Сайдулаев В. А., Коханов А. В., Кчибеков Э. А., Гудинская Н. И., Жмыхов Д. В. Сравнение уровней лактоферрина и фетального гемоглобина в крови пожилых жителей юга Астраханской области и горных районов Дагестана. Современные проблемы науки и образования. 2023;4:91-98.
7. Ascenzi P. et al. Neuroglobin: From structure to function in health and disease. *Molecular Aspects of Medicine.* 2016;52:1-49.
8. Emara M., Turner A. R., Allalunis-Turner J. Hypoxic regulation of cytoglobin and neuroglobin expression in human normal and tumor tissues. *Cancer Cell Int.* 2010 Sep 9;10:33. doi: 10.1186/1475-2867-10-33.
9. Li R. C., Guo S. Z., Lee S. K., Gozal D. Neuroglobin protects neurons against oxidative stress in global ischemia. *J. Cereb. Blood. Flow. Metab.* 2010;30(11):1874-82. doi: 10.1038/jcbfm.2010.90.
10. Wang X., Liu J., Zhu H., Tejima E., Tsuji K., Murata Y., Atochin D. N., Huang P. L., Zhang C., Lo E. H. Effects of neuroglobin overexpression on acute brain injury and long-term outcomes after focal cerebral ischemia. *Stroke.* 2008;39(6):1869-74. doi: 10.1161/STROKEAHA.107.506022.
11. Xue L., Chen H., Lu K., et al. Clinical significance of changes in serum neuroglobin and HIF-1 $\alpha$  concentrations during the early-phase of acute ischemic stroke. *J. Neurol. Sci.* 2017; 375:52-5-7.
12. Узлова Е. В., Зиматкин С. М. Нейропротекторное действие нейроглобина при гипоксии/ишемии. Сибирский научный медицинский журнал. 2021;41(2):33-39. doi: 10.18699/SSMJ20210205.
13. Steinberg M. H., Chui D. H., Dover G. J., Sebastiani P., Alsultan A. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: a glass half full? *Blood.* 2014;123(4):481-485.
14. Thein S. L., Menzel S. Discovering the genetics underlying fetal haemoglobin production in adults. *British Journal of Haematology.* 2009;145(4):455-467.
15. Бисалиева Р. А., Кривенцев Ю. А., Бисалиев Р. В., Кальной В. С. Иммунохимический анализ фетального гемоглобина в крови наркологических больных. Наркология. 2009;8(1):95-97.
16. Кривенцев Ю. А., Никулина Д. М., Бисалиева Р. А. Иммунохимический анализ концентрации фетального гемоглобина в крови новорожденных мальчиков и девочек с внутриутробной гипоксией. Омский научный вестник. 2006;46(9):272-274.
17. Мяснянкин А. А., Коханов А. В., Белопасов В. В., Метелкина Е. В., Кривенцев Ю. А. Пульсоксиметрия и мониторинг железосодержащих белков крови у больных с черепно-мозговой травмой. Астраханский медицинский журнал. 2011;3:243-245.
18. Пирадов М. А., Максимова М. Ю., Танащян М. М. Инсульт: пошаговая инструкция. Руководство для врачей. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2019.
19. Суслина З. А., Гулевская Т. С., Максимова М. Ю., Моргунов В. А. Нарушение мозгового кровообращения: диагностика, лечение, профилактика. М.: Медпресс-информ; 2016.

20. Лукьянчиков В. А., Удодов Е. В. Тактика хирургического лечения острой ишемии головного мозга, обусловленной атеросклеротическим поражением брахиоцефальных артерий. *Нейрохирургия* 2020;22(3):31-41.

21. Литвиненко М. А. Эффективность каротидной эндартерэктомии у больных, перенесших ишемический инсульт. *Военно-медицинский журнал*. 2021;342(4):78-80.

22. Узденов М. Б., Эбзеева Л. Х., Сариева А. А., Гочияева А. А. Повреждение черепных нервов после каротидной эндартерэктомии. *Курортная медицина*. 2023;4:98-102. doi: 10.51871/23040343\_2023\_4\_98.

23. Казанцев А. Н., Виноградов Р. А., Жарова А. С., Кравчук В. Н. Спорные вопросы каротидной эндартерэктомии. *Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия*. 2022;15 (3):248–260. doi:10.17116/kardio202215031248.

## REFERENCES

1. Yushkov B. G., Chereshev V. A., Brilliant S. A. Heterogeneous hemoglobin system and its role in health and disease. *Clinical Pathophysiology*. 2020;26(2):22-36. (In Russ.).

2. Kriventsev Yu. A., Kriventseva L. A. Human hemoglobins as diagnostic markers. *Scientific review. Medical sciences*. 2018;1:16-20. (In Russ.).

3. Burmester T., Gerlach F., Hankeln T. Regulation and role of neuroglobin and cytoglobin under hypoxia. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2007;618:169-180.

4. Nikulina D. M., Kriventsev Yu. A., Bisalieva R. A., Lapeko S. V. New immunochemical test for laboratory assessment of erythron state. *Clinical laboratory diagnostics*. 2009;12:27-30. (In Russ.).

5. Kokhanov A. V., Shininova S. V., Voronkova M. Yu., Bisalieva R. A. Normative indicators of red blood in healthy preschool children in the south of the Astrakhan region. *Modern problems of science and education*. 2016. No. 5. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=25205>. (Accessed 12.03.2024). (In Russ.).

6. Shininova S. V., Satasheva Z. M., Saidulaev V. A., Kokhanov A. V., Kchibekov E. A., Gudinskaya N. I., Zhmykhov D. V. Comparison of the levels of lactoferrin and fetal hemoglobin in the blood of elderly residents of the south of the Astrakhan region and the mountainous regions of Dagestan. *Modern problems of science and education*. 2023;4:91-98. (In Russ.).

7. Ascenzi P. et al. Neuroglobin: From structure to function in health and disease. *Molecular Aspects of Medicine*. 2016;52:1-49.

8. Emara M., Turner A. R., Allalunis-Turner J. Hypoxic regulation of cytoglobin and neuroglobin expression in human normal and tumor tissues.

*Cancer Cell Int*. 2010 Sep 9;10:33. doi: 10.1186/1475-2867-10-33.

9. Li R. C., Guo S. Z., Lee S. K., Gozal D. Neuroglobin protects neurons against oxidative stress in global ischemia. *J. Cereb. Blood. Flow. Metab.* 2010;30(11):1874-82. doi: 10.1038/jcbfm.2010.90.

10. Wang X., Liu J., Zhu H., Tejima E., Tsuji K., Murata Y., Atochin D. N., Huang P. L., Zhang C., Lo E. H. Effects of neuroglobin overexpression on acute brain injury and long-term outcomes after focal cerebral ischemia. *Stroke*. 2008;39(6):1869-74. doi: 10.1161/STROKEAHA.107.506022.

11. Xue L., Chen H., Lu K., et al. Clinical significance of changes in serum neuroglobin and HIF-1 $\alpha$  concentrations during the early-phase of acute ischemic stroke. *J. Neurol. Sci.* 2017; 375:52-5-7.

12. Uzlova E. V., Zimatkin S. M. Neuroprotective effect of neuroglobin during hypoxia/ischemia. *Siberian Scientific Medical Journal*. 2021;41(2):33-39. (In Russ.). doi: 10.18699/SSMJ20210205.

13. Steinberg M. H., Chui D. H., Dover G. J., Sebastiani P., Alsultan A. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: a glass half full? *Blood*. 2014;123(4):481-485.

14. Thein S. L., Menzel S. Discovering the genetics underlying fetal haemoglobin production in adults. *British Journal of Haematology*. 2009;145(4):455-467.

15. Bisalieva R. A., Kriventsev Yu. A., Bisalyev R. V., Kalnoy V. S. Immunochemical analysis of fetal hemoglobin in the blood of narcological patients. *Narcology*. 2009;8(1):95-97. (In Russ.).

16. Kriventsev Yu. A., Nikulina D. M., Bisalieva R. A. Immunochemical analysis of the concentration of fetal hemoglobin in the blood of newborn boys and girls with intrauterine hypoxia. *Omsk Scientific Bulletin*. 2006;46(9):272-274. (In Russ.).

17. Myasnyankin A. A., Kokhanov A. V., Belopasov V. V., Metelkina E. V., Kriventsev Yu. A. Pulse oximetry and monitoring of iron-containing proteins in the blood in patients with traumatic brain injury. *Astrakhan Medical Journal*. 2011;3:243-245. (In Russ.).

18. Piradov M. A., Maksimova M. Yu., Tanashyan M. M. *Stroke: step-by-step instructions. Guide for doctors*. Moscow : GEOTAR-Media; 2019. (In Russ.).

19. Suslina Z. A., Gulevskaya T. S Maksimova M. Yu., Morgunov V. A. *Cerebrovascular accident: diagnosis, treatment, prevention*. Moscow : Medpress-inform; 2016. (In Russ.).

20. Lukyanchikov V. A., Udodov E. V. Tactics of surgical treatment of acute cerebral ischemia caused by atherosclerotic lesions of the brachiocephalic arteries. *Neurosurgery* 2020; 22(3):31-41. (In Russ.).

21. Litvinenko M. A. Efficiency of carotid endarterectomy in patients who suffered ischemic

stroke. Military Medical Journal. 2021;342(4):78-80. (In Russ.).

22. Uzdenov M. B., Ebzeeva L. Kh., Sarieva A. A., Gochiyaeva A. A. Cranial nerve damage after carotid endarterectomy. Resort Medicine. 2023;4:98-102. (In Russ.). doi:10.51871/23040343\_2023\_4\_98.

23. Kazantsev A. N., Vinogradov R. A., Zharova A. S., Kravchuk V. N. Controversial issues of carotid endarterectomy. Cardiology and cardiovascular surgery. 2022;15(3):248–60. doi: 10.17116/kardio202215031248. (In Russ.).

УДК 618.177:616-001.2

DOI: 10.29039/2224-6444-2024-14-2-47-51

## ОСОБЕННОСТИ ПРОЛИФЕРАЦИИ И АПОПТОЗА Фолликулярных Клеток при введении аскорбиновой кислоты в модели радиационно-индуцированной овариальной недостаточности

Пугачева Е. Н., Вадюхин М. А., Муртазалиева З. М., Игнатко И. В.

ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119048, ул. Трубецкая, 8, стр.2, Москва, Россия

Для корреспонденции: Пугачева Екатерина Николаевна, аспирант института трансляционной медицины и биотехнологии Первого МГМУ им. И. М. Сеченова (Сеченовский Университет), e-mail: rouzella@mail.ru

For correspondence: Pugacheva Ekaterina Nikolaevna, postgraduate student of the Institute of Translational Medicine and Biotechnology of the Sechenov University, e-mail: rouzella@mail.ru

### Information about authors:

Pugacheva E. N., <https://orcid.org/0009-0009-2268-3838>

Vadyukhin M. A., <https://orcid.org/0000-0002-6235-1020>

Murtazaliev Z. M., <https://orcid.org/0009-0000-2361-7618>

Ignatko I. V., <https://orcid.org/0000-0002-9945-3848>

### РЕЗЮМЕ

Облучение злокачественных новообразований может приводить к повреждению здоровых яичников с развитием преждевременной овариальной недостаточности. Электроны считаются наиболее безопасным для здоровых тканей видом облучения. Актуальной остается разработка способов радиопротекции, одним из которых может быть предлучевое введение аскорбиновой кислоты. Цель исследования: иммуногистохимическая оценка пролиферации и апоптоза фолликулярных клеток, лютеоцитов и текацитов при введении аскорбиновой кислоты в модели лучевого повреждения яичника. Материал и методы. Крысы породы Вистар (самки, n=40) были поделены на контрольную (n=10); группу, фракционно облученную электронами в суммарной дозе 30 Гр (n=10); группу, которой вводили аскорбиновую кислоту перед облучением (n=10); группу, получавшую только аскорбиновую кислоту (n=10). Эксперимент продолжался в течение трех месяцев. Затем, фрагменты яичников исследовали гистологическим и иммуногистохимическим (с антителами к Ki-67 и каспазе-3) методами. Результаты. Воздействие электронами привело к развитию признаков радиационно-индуцированной овариальной недостаточности: снижение количества примордиальных фолликулов и разрастание волокнистой соединительной ткани с преобладанием экспрессии каспазы-3 в фолликулярных клетках над Ki-67. В группе предлучевого введения аскорбиновой кислоты гистологическая картина, а также значения Ki-67 и каспазы-3 в овариальных фолликулах приближались к контрольным. Обсуждение. Предлучевое введение аскорбиновой кислоты индуцирует процессы репарации и регенерации фолликулярных клеток, вероятно, посредством увеличения их пролиферативной активности и других факторов интраовариальной регуляции. Это ускоряет восстановление овариальных фолликулов и замедляет развитие преждевременной овариальной недостаточности в отдаленные сроки. Заключение. На третьем месяце после локального воздействия электронами в дозе 30 Гр формируется паттерн радиационно-индуцированного фиброза и преждевременной овариальной недостаточности. Предварительное введение аскорбиновой кислоты обеспечивает защиту овариальных фолликулов и практически предотвращает развитие лучевых осложнений на поздних стадиях, способствуя процессам репарации и регенерации фолликулярных клеток.

**Ключевые слова:** апоптоз, электроны, репарация, аскорбиновая кислота, яичник

### FEATURES OF FOLLICULAR CELL PROLIFERATION AND APOPTOSIS WITH ASCORBIC ACID INTRODUCING IN A MODEL OF RADIATION-INDUCED OVARIAL INSUFFICIENCY

Pugacheva E. N., Vadyukhin M. A., Murtazaliev Z. M., Ignatko I. V.

First Moscow State Medical University named after I. M. Sechenov (Sechenov University), Moscow, Russia

### SUMMARY

Irradiation of malignant neoplasms can lead to damage to healthy ovaries with the development of premature ovarian failure. Electrons are considered the safest type of irradiation for healthy tissues. The development of radioprotection methods remains relevant, one of which may be pre-radiation administration of ascorbic acid. Aim of the study: proliferation and apoptosis analysis in ovarian follicular cells, luteocytes and theca cells upon administration of ascorbic acid after electron irradiation. Material and methods. Wistar rats (female, n=40) were divided into control (n=10); group of 30 Gy fractional electron irradiation (n=10); group administered ascorbic acid before irradiation (n=10); group administered ascorbic acid only (n=10). The experiment lasted for three months. Then, ovarian fragments were examined by histological method as well as reactions with antibodies to Ki-67 and caspase-3. Results. Exposure to electrons resulted in the development of signs of radiation-induced ovarian failure: a decrease in primordial follicles number and proliferation of fibrous connective tissue with a predominance of caspase-3 expression in follicular cells over Ki-67. In the pre-radiation ascorbic acid administration group, the histological picture, as well as the values of Ki-67 and caspase-3 in ovarian follicles, approached the control. Discussion. Pre-radiation administration of ascorbic

acid induces the processes of reparation and regeneration of follicular cells, probably by increasing their proliferative activity and other factors of intraovarian regulation. This accelerates the restoration of ovarian follicles and slows the development of premature ovarian failure in the long term. Conclusion. Three months after local exposure to electrons at a total dose of 30 Gy, a pattern of radiation-induced fibrosis and premature ovarian failure is formed. Pre-radiation administration of ascorbic acid leads to protection of ovarian follicles and prevents the development of radiation complications in the long term.

**Key words:** apoptosis, electrons, reparation, ascorbic acid, ovary

Облучение метастазов или злокачественных новообразований органов малого таза может приводить к повреждению здоровых яичников с развитием радиационно-индуцированной преждевременной овариальной недостаточности (ПОН) [1]. Гибель критического количества фолликулов в отдаленные сроки связана с развитием временного или постоянного бесплодия [2]. Однако, в большинстве исследований описаны изменения в остром периоде, в то время как описанию отдаленных побочных эффектов лучевой терапии посвящено меньшее количество работ.

Яичники (овариальные фолликулы) являются одним из наиболее радиочувствительных органов [3]. Так, воздействие X- и гамма-излучения приводит к атрофии, некрозу и / или фиброзу тканей яичников [4; 5]. Однако, многие исследовательские группы активно изучают электронотерапию, которая, вероятно, является наиболее безопасной для здоровых тканей, попадающих в зону облучения [6].

Учитывая высокую пролиферативную активность фолликулярных клеток, а также их радиационно-индуцированную гибель путем апоптоза, интригующей представляется оценка пролиферативной активности и гибели (вероятно, путем апоптоза) клеток овариальных фолликулов с проведением реакций с антителами к Ki-67 и каспазе-3.

Кроме того, необходимы исследования, посвященные апробации новых способов радиопротекции структур яичников, одним из которых может быть предлучевое введение антиоксидантов [7]. Многообещающим является применение аскорбиновой кислоты, эффективность которой при лучевых поражениях была доказана во многих тканях, а механизмы действия связаны не только со способностью связывать и утилизировать свободные оксидантные радикалы, но и, вероятно, предотвращать формирование мутаций в цепях ДНК посредством связывания ионов меди [8]. Некоторые авторы не исключают также возможность аскорбиновой кислоты к индукции репарации тканей и ее антиапоптотического действия [9].

Полученные данные могут дополнить существующую информацию об эффектах электронотерапии в яичниках, дать количественную характеристику пролиферации и апоптоза, а также

оценить влияние аскорбиновой кислоты на жизненный цикл фолликулярных клеток, лютеоцитов и текацитов в отдаленные сроки.

Цель исследования: иммуногистохимическая оценка пролиферации и апоптоза фолликулярных клеток, лютеоцитов и текацитов при введении аскорбиновой кислоты в модели лучевого повреждения яичника.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Самки крыс породы Wistar (n=40) были в случайном порядке распределены на четыре равные группы (по 10 животных в каждой): I – контрольная; II – облучение электронами в суммарной очаговой дозе (СОД) 30 Гр в фракционном режиме; III – аскорбиновую кислоту в дозе 50 мг / кг вводили интраперитонеально перед каждой фракцией облучения электронами; IV – интраперитонеальное введение аскорбиновой кислоты в дозе 50 мг / кг.

Датой окончания эксперимента считали 90-е сутки после завершения последнего этапа облучения электронами. Во время проведения болезненных процедур и для эвтаназии использовалась комбинация кетамина и ксилазина, при этом соблюдались принципы, изложенные в Хельсинской декларации, «Европейской Конвенции об охране позвоночных животных, используемых для экспериментов или в других научных целях» (№ 123, Страсбург), а также «Руководстве по содержанию и использованию лабораторных животных» (ILAR).

После извлечения фрагменты яичников нарезали каждые 2 мм и фиксировали в растворе формалина, затем подготавливали к гистологическому исследованию по стандартной методике. Полученные серийные срезы (3 мм толщиной) депарафинировали и дегидратировали, окрашивали гематоксилином и эозином. Микропрепараты исследовали в 10 случайных полях зрения светового микроскопа при увелич. x400 (Leica DM3000, Германия).

При постановке иммуногистохимических реакций в качестве первичных использовали антитела к Ki-67 (ThermoFisher, Clone MM1) и caspase 3 (ThermoFisher, Clone 74T2). Вторичные антитела определяли при помощи двухкомпонентной системы детекции HiDef Detection™ HRP

Polymer system, (Cell Marque, США), анти-IGG мыши/кролика, пероксидазы хрена и субстрата DAB. Затем осуществляли демаскировку антигенов (в цитратном буферном растворе), охлаждение и промывку с последующим докрасиванием ядер гематоксилином Майера. Фолликулярные клетки, а также клетки желтого тела и текальной оболочки подсчитывали в 10 рандомных полях зрения светового микроскопа при увелич. x400 с определением соотношения окрашенных клеток к общему числу клеток в %.

Статистическая обработка. Полученные в результате подсчета данные обрабатывали в программе SPSS 12 (IBM Analytics, США). Представленные числовые значения выражены как среднее  $\pm$  стандартная ошибка (SE). Значение  $p < 0,05$  считали статистически значимым.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

При гистологическом исследовании фрагментов яичников через 3 месяца после воздействия электронов отмечали признаки радиационно-индуцированного фиброза: разрастание соединительной ткани, которая занимала до 1/3 части органа, а также утолщение стромальных соединительнотканых тяжей и стаз в просвете гемокapилляров. Кроме того, обнаружили резкое снижение количества примордиальных фолликулов при сравнении с контролем. Обнаруженные морфологические изменения овариальных фоллику-

лов были менее выражены в группе предлучевого введения аскорбиновой кислоты. Так, волокнистая соединительная ткань занимала меньшую площадь, преимущественно локализуясь в корковом веществе; количество примордиальных фолликулов было близким к контрольным значениям.

При иммуногистохимическом исследовании яичников через 3 месяца после воздействия электронами наблюдали снижение пролиферативной активности (Ki-67) фолликулярных клеток и незначительное увеличение каспазы-3-иммуномечения по сравнению с контролем. Уровни Ki-67 и каспазы 3 в желтом теле были в пределах контрольных значений, в то время как во внутренней оболочке фолликулов количество Ki-67-окрашенных текацитов превышало показатели контрольной группы при нормальных уровнях экспрессии каспазы 3.

В то же время, предлучевое введение аскорбиновой кислоты обеспечило практически полное восстановление пролиферативно-апоптотического соотношения фолликулярных клеток, текацитов и лютеоцитов. Однако, уровень экспрессии Ki-67 в клетках гранулезной и текальной оболочек фолликулов статистически превышали контрольные значения.

В образцах яичников IV-ой группы при гистологическом и иммуногистохимическом исследовании не отмечали статистически значимых отличий от показателей контрольной группы.

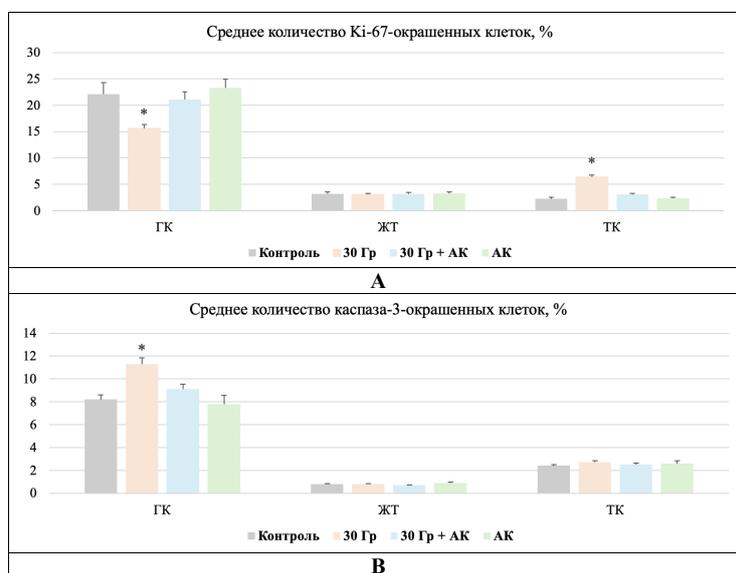
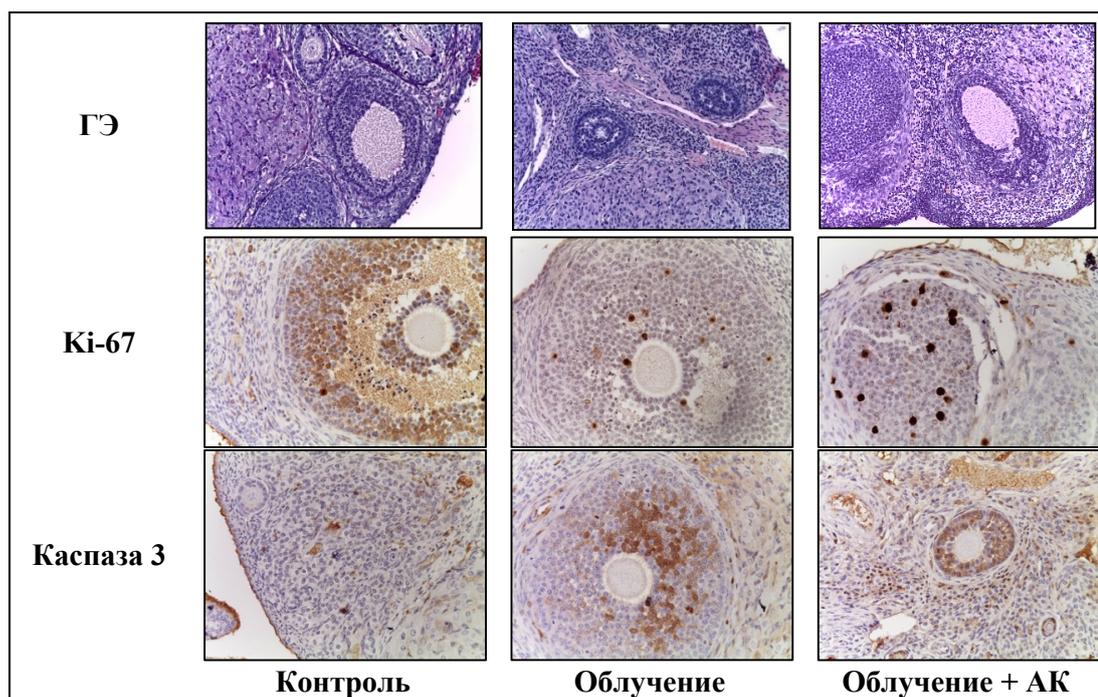


Рис. 1. Количество окрашенных клеток гранулезной оболочки (ГК), желтого тела (ЖТ) и тека-клеток (ТК) в яичниках при проведении иммуногистохимического анализа уровней экспрессии Ki-67 (А) и каспазы 3 (В), график. \* - статистически значимое сравнение по сравнению с контрольной группой,  $p < 0,05$ . АК – аскорбиновая кислота

Fig.1. The number of stained cells of the granulosa membrane (ГК), corpus luteum (ЖТ) and thecal membrane (ТК) during immunohistochemical reactions with antibodies to Ki-67 (A) and caspase 3 (B), graph. \* - statistically significant compared to the control,  $p < 0.05$ . АК – ascorbic acid



**Рис. 2.** Фрагменты яичников контрольной и опытных групп. Морфологическое (окрашивание гематоксилином и эозином) и иммуногистохимическое (окрашивание с антителами к Ki-67 и каспазе 3) исследования, увелич.×400.

**Fig. 2.** Fragments of ovaries of the control and experimental groups. Morphological (staining with hematoxylin and eosin) and immunohistochemical (staining with antibodies to Ki-67 and caspase 3) studies, magn. ×400.

## ОБСУЖДЕНИЕ

На основании результатов проведенного исследования можно говорить о повреждении яичников после воздействия электронами в суммарной дозе 30 Гр, осложнения которого (такие как радиационно-индуцированный фиброз и радиационно-индуцированная ПОН) могут сохраняться в течение длительного периода времени. Это сопровождается уменьшением количества примордиальных фолликулов на фоне увеличения объемной доли соединительнотканного компонента яичников.

Перечисленные морфологические изменения можно рассматривать как компенсаторно-приспособительную реакцию структур яичников, формирующуюся в течение длительного времени в ответ на гибель овариальных фолликулов в остром постлучевом периоде [10]. Благодаря исследованиям других авторов, можно говорить об апоптотической и некротической смерти активно пролиферирующих фолликулярных клеток, а также о развитии локального воспаления в яичниках на ранних сроках после лучевого воздействия, что приводит к необходимости замещения утраченных клеток и ограничения воспалительной реакции [4]. При участии ключевых факторов фиброгенеза, таких как цитокины и ростовые фак-

торы (например, IL-6, IL-8, TGF- $\alpha$ , эндотелин, MMPs, VEGF-A, CTGF и др.), активируются механизмы тканевой репарации, что способствует усилению пролиферации фолликулярных клеток и снижению синтеза провоспалительных цитокинов [10]. Также происходит отложение волокон внеклеточного матрикса в результате индукции коллагеногенеза и ангиогенеза [1]. Мобилизация биохимических и метаболических реакций ведет к увеличению объема фиброзной ткани, что, в свою очередь, снижает функционально активную массу фолликулов.

Отдельный интерес вызывает морфологическая оценка текацитов, которые даже спустя 3 месяца после воздействия электронами были с признаками компенсаторной гиперплазии, направленной на поддержание гормон-синтезирующей функции яичников. Вероятно, это связано со снижением уровней половых гормонов в системном кровотоке [11].

Особый интерес в нашей работе был посвящен гистологическому и иммуногистохимическому анализу овариальных фолликулов в группе предлучевого введения аскорбиновой кислоты. Ее антиоксидантные свойства привели к сохранению большей части овариальных фолликулов. Спустя три месяца пролиферативная активность фолликулярных клеток, лютеоцитов и текацитов

была приближена к значениям контрольной группы, что может свидетельствовать о завершении репарации яичников и восстановлении их структуры и функций. Мы не обнаружили достоверных признаков развития радиационно-индуцированной ПОН в отдаленные сроки, что не только служит подтверждением позитивного действия аскорбиновой кислоты в яичниках после воздействия электронами, но и косвенно может говорить о стимулирующем влиянии этого вещества на процессы репарации [12].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На третьем месяце после локального воздействия электронами в дозе 30 Гр формируется паттерн радиационно-индуцированного фиброза и преждевременной овариальной недостаточности. Предварительное введение аскорбиновой кислоты обеспечивает защиту овариальных фолликулов и практически предотвращает развитие лучевых осложнений на поздних стадиях, способствуя процессам репарации и регенерации фолликулярных клеток. Это, вероятно, происходит за счет увеличения их пролиферативной активности и воздействия других факторов интраовариальной регуляции.

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

**Conflicts of interest.** The authors have no conflicts of interest to declare.

### ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Kim S., Kim S. W., Han S. J. Molecular Mechanism and Prevention Strategy of Chemotherapy- and Radiotherapy-Induced Ovarian Damage. *Int J Mol Sci.* 2021;22(14):7484. doi:10.3390/ijms22147484.
2. Griffiths M. J., Marshall S. A., Cousins F. L. Radiotherapy exposure directly damages the uterus and causes pregnancy loss. *JCI Insight.* 2023;8(6):e163704. doi:10.1172/jci.insight.163704.
3. Lapierre A., Gourgou S., Brengues M. Tumour and normal tissue radiosensitivity. *Cancer Radiother.* 2022;26(1-2):96-103. doi:10.1016/j.canrad.2021.11.008.
4. Mantawy E. M., Said R. S., Kassem D. H., Abdel-Aziz A. K., Badr A. M. Novel molecular

mechanisms underlying the ameliorative effect of N-acetyl-L-cysteine against  $\gamma$ -radiation-induced premature ovarian failure in rats. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2020;206:111190. doi:10.1016/j.ecoenv.2020.111190.

5. Reiser E., Bazzano M. V., Solano M. E. Unlaid Eggs: Ovarian Damage after Low-Dose Radiation. *Cells.* 2022;11(7):1219. doi:10.3390/cells11071219.

6. Calvo F. A., Serrano J., Cambeiro M. Intra-Operative Electron Radiation Therapy: An Update of the Evidence Collected in 40 Years to Search for Models for Electron-FLASH Studies. *Cancers (Basel).* 2022;14(15):3693. doi:10.3390/cancers14153693.

7. Wieland L. S., Moffet I., Shade S. Risks and benefits of antioxidant dietary supplement use during cancer treatment: protocol for a scoping review. *BMJ Open.* 2021;11(4):e047200. doi:10.1136/bmjopen-2020-047200.

8. Cai L., Koropatnick J., Cherian M. G. Roles of vitamin C in radiation-induced DNA damage in presence and absence of copper. *Chem Biol Interact.* 2001;137(1):75-88. doi:10.1016/s0009-2797(01)00210-1.

9. Gęgotek A., Ambrożewicz E., Jastrząb A., Jarocka-Karpowicz I., Skrzydlewska E. Rutin and ascorbic acid cooperation in antioxidant and antiapoptotic effect on human skin keratinocytes and fibroblasts exposed to UVA and UVB radiation. *Arch Dermatol Res.* 2019;311(3):203-219. doi:10.1007/s00403-019-01898-w.

10. Duncan F. E., Kimler B. F., Briley S. M. Combating radiation therapy-induced damage to the ovarian environment. *Future Oncol.* 2016;12(14):1687-1690. doi:10.2217/fon-2016-0121.

11. Shabbir S., Khurram E., Moorthi V. S., Eissa Y. T. H., Kamal M. A., Butler A. E. The interplay between androgens and the immune response in polycystic ovary syndrome. *J Transl Med.* 2023;21(1):259. doi:10.1186/s12967-023-04116-4.

12. Bechara N., Flood V. M., Gunton J. E. A Systematic Review on the Role of Vitamin C in Tissue Healing. *Antioxidants (Basel).* 2022;11(8):1605. doi:10.3390/antiox11081605.

## КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ТУЧНЫХ КЛЕТОК В СЕМИНОМЕ

Щекин В. И.

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава РФ, 105425, ул. Парковая 3-я, 51 стр. 4, Москва, Россия

**Для корреспонденции:** Щекин Владимир Иванович, лаборант-исследователь лаборатории экспериментальной морфологии и цифровой патологии МРНЦ им. А. Ф. Цыба – филиал «НМИЦ радиологии» Минздрава России, e-mail: dr.shchekin@mail.ru

**For correspondence:** Vladimir Shchekin, laboratory assistant-researcher, laboratory of experimental morphology and digital pathology, A.F. Tsyb Medical Research Center – branch of the National Medical Research Center of Radiology, Ministry of Health of the Russian Federation; e-mail: dr.shchekin@mail.ru

### Information about authors:

Shchekin V. I., <https://orcid.org/0000-0003-3763-7454>

### РЕЗЮМЕ

Герминогенные опухоли (ГО) яичка, в основном, встречаются в возрасте от 15 до 40 лет, что часто приводит к бесплодию. Семинома составляет около половины всех ГО. Методом лечения семиномы является орхифунгулэктомия, при необходимости в комбинации с адъювантной химиотерапией и лучевой терапией. В современной литературе описаны морфологический и молекулярно-генетический аспекты семиномы. Однако мало изученным остается взаимоотношение атипичных клеток семиномы и иммунокомпетентных клеток микроокружения, в первую очередь, тучных клеток (ТК). Цель исследования. Количественная оценка тучных клеток в семиноме. Материал и методы. Нами была проведена сравнительная количественная оценка ТК у пациентов с семиномой (n=44), после орхифунгулэктомии, а также в группе сравнения с интактными яичками (n=11). Результаты исследования. При сравнительном гистологическом и гистохимическом анализе яичек с семиномой, окрашенных толуидиновым синим, обнаружили снижение количества ТК в интерстициальной ткани в 3,3 раза по сравнению с образцами группы сравнения. Единичные тучные клетки были с признаками слабой дегрануляции. Заключение. Семинома характеризуется снижением количества тучных клеток по сравнению с интактными яичками, что не исключает возможность использования данного критерия в качестве прогностического маркера.

**Ключевые слова:** семинома, герминогенные опухоли, тучные клетки, орхифунгулэктомия.

### QUANTITATIVE CHARACTERISTICS OF MAST CELLS IN SEMINOMA

Shchekin V. I.

National Medical Research Radiological Centre, Moscow, Russia.

### SUMMARY

Germ cell tumors (GC) of the testicle are mainly found in people aged 15 to 40 years, often resulting in infertility. Seminoma accounts for about half of all GC. The treatment method for seminoma is orchietomy, if necessary in combination with adjuvant chemotherapy and radiation therapy. The morphological and molecular genetic aspects of seminoma are described in modern literature. However, the relationship between atypical seminoma cells and their microenvironment, primarily the state of immunocompetent cells, remains poorly understood. Aim. Quantitative assessment of mast cells in seminoma. Methods. We conducted a comparative quantitative assessment of TC in patients with seminoma (n=44), after orchietomy, as well as in patients of group II (n=11) with intact testicles. Results. A comparative histochemical analysis of testicles with seminoma stained with toluidine blue revealed a 3.3-fold decrease in the number of mast cells in the interstitial tissue compared to samples from Group II. Single mast cells showed signs of weak degranulation. Conclusions. Seminoma is characterized by a decrease in the number of mast cells compared to intact testicles, which does not exclude the possibility of using this criterion as a prognostic marker.

**Key words:** seminoma, germ cell tumors, mast cells, orchifuniculectomy.

Герминогенные опухоли (ГО) яичка встречаются довольно редко, в основном у мужчин в возрасте от 15 до 40 лет, что часто приводит к бесплодию [1; 2]. ГО составляют 1–2% всех злокачественных опухолей у мужчин [3]. В странах Европы ежегодно обнаруживают от 3 до 10 новых случаев на 100000 пациентов, а за последние годы это число увеличилось [4]. Согласно данным «Клиническим рекомендациям по герми-

ногенным опухолям у мужчин», в России в 2018 году было зарегистрировано 1480 новых случаев опухолей яичка, а смертность составила 1/5 часть пациентов, что почти в 5,0 раз превышает показатели летального исхода в странах Западной Европы [5].

Семинома составляет около половины всех ГО [6]. Она развивается из первичных сперматогенных клеток, в отличие от несеминомы [7].

Согласно pTNM-системе, выделяют IA, IB, IS, IIA, IIB, IIC, IIIA, IIIB, IIIC стадии опухолевого роста семиномы. Кроме того, семиному дополнительно стадияруют показателем S (serum tumour markers) – по уровню  $\beta$ -хорионического гонадотропина человека (ХГЧ),  $\alpha$ -фетопротеина (АФП) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ) [8].

Комплексное лечение семиномы, в зависимости от стадии, включает в себя хирургическое, адъювантную химиотерапию и лучевую терапию, а также проводят динамическое наблюдение для снижения рисков метастазирования [9; 10]. Выживаемость среди пациентов, начавших лечение на I стадии заболевания – около 99%. Критерием благоприятного прогноза считается отсутствие метастазов и нормальный уровень сывороточных маркеров [11; 12].

В современной специализированной литературе описаны морфологический и молекулярно-генетический аспекты как происхождения семиномы, так и жизнедеятельности опухоли, ее прогрессии и регрессии, а также метастазирования. Однако мало изученным остается взаимоотношение атипичных клеток семиномы и их микроокружение, в первую очередь, состояние иммунокомпетентных клеток. Микроокружение (tumor microenvironment, TME) представлено разнообразием клеточных дифференцированных клеток (Т- и В-лимфоциты, макрофаги, НК-клетки), опухоль-ассоциированные фибробласты, микрососуды, и внеклеточный матрикс [13].

Учитывая активное развитие методов клеточной биологии и патобиологии, а также согласно данным ряда иммунофенотипических исследований, количественная и качественная характеристика различных клеток микроокружения может коррелировать с молекулярно-генетическими свойствами атипичных клеток семиномы и влиять на туморогенез, резистентность к иммунотерапии [14; 15].

Атипичные сперматогенные клетки способны оказывать влияние на активацию Т-лимфоцитов и моноцитов. В частности, было показано, что в опухоли увеличивается экспрессия CD3+ CD4+ Т-лимфоцитов, CD25, HLA-DR+, CD14+ моноцитов, CD163 макрофагов [14]. Особенно в последнее время, в связи с активным внедрением различных биологически активных веществ в таргетную иммунотерапию ряда опухолей, актуализируется вопрос о роли рецептора PD-1 и его лиганда PD-L1 во взаимоотношениях Т-лимфоцитов с атипичными клетками семиномы [13]. При этом остается неизвестным, какие именно иммунокомпетентные клетки влияют на стволовую опухолевую нишу, какие механизмы канцерогенеза запускаются, особая роль в этом, возможно, принадлежит тучным клеткам (ТК).

Согласно немногочисленным литературным данным, можно полагать, что ТК обладают важнейшими регуляторными эффектами по сравнению с другими клеточными субпопуляциями при формировании морфогенетических ниш локального тканевого микроокружения (ЛТМ), способствующего или препятствующего прогрессированию опухолевого роста. Поэтому, необходимо, проведение количественного и качественного анализа ТК в семиноме.

Цель исследования – количественная оценка тучных клеток в семиноме.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Согласно анамнестическим и клинико-морфологическим данным, были сформированы следующие группы:

I группа (n = 44; возраст 21–44 лет) – архивные парафиновые блоки операционного материала семиномы, полученные после орхифуникулэктомии.

У 36 пациентов новообразование яичка было определено при ультразвуковом исследовании мошонки, у 8 – по результатам КТ органов брюшной полости. 12 отмечали болезненность в паховой области. Химиотерапия ни в одном из случаев не проводилась.

II группа – сравнение (n = 11, возраст 21–44 лет) – аутопсийный материал интактных яичек, полученные в течение 6 часов после констатации биологической смерти. Проявлений онкологического процесса и/или воспаления, наблюдаемых макроскопически, не отмечено. В семейном анамнезе: один и более ребенок. Причины смерти: язва желудка с прободением и/или кровотечением, обструктивный пиелонефрит, панкреатит, аневризмы различной локализации, врожденные пороки развития, но не мочевыделительной и/или репродуктивной системы, летальные травмы.

Критерии исключения: подтвержденное бесплодие, не связанное с наличием семиномы, сахарный диабет и другие заболевания эндокринной системы, ожирение, инфекционные заболевания, сепсис.

### *Морфологическое исследование.*

Фрагменты яичек фиксировали в растворе забуференного формалина, дегидратировали, проводили и заливали в парафин. Из парафиновых блоков готовили срезы толщиной 3 мкм, помещали их на предметные стекла, депарафинировали, регидратировали, окрашивали гематоксилином и эозином. Для обнаружения тучных клеток из каждой серии отбирался один срез, который окрашивали толуидиновым синим.

Микроскопическое исследование проводили на системе видео-микроскопии (микроскоп Leica DM2000, Германия; камера Leica ICC50 HD).

Количество тучных клеток и иммунных клеток подсчитывали при компьютерной морфометрии в 10 полях зрения суммарной площадью 1,6 мм<sup>2</sup>. После этого количество тучных клеток рассчитывали по формуле на 1 мм<sup>2</sup>.

#### Статистический анализ.

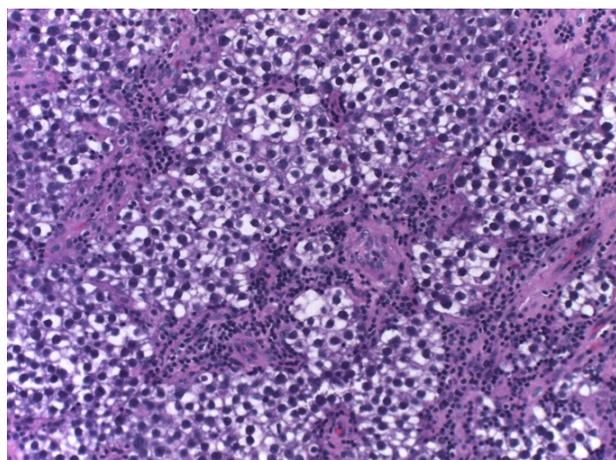
Данные гистохимического исследования обрабатывались в компьютерной программе SPSS 12.0 (IBM Analytics, США). При сравнении был применен дисперсионный анализ. Проверки выборки на принадлежность нормальной генеральной совокупности проводилась с использованием критерия Шапиро-Уилка. Для сопоставления средних значений выборок применяли Н-критерий Краскела-Уоллиса (Kruskal-Wallis H-test). Статистически значимыми считались различия при  $p < 0,05$ .

### РЕЗУЛЬТАТЫ

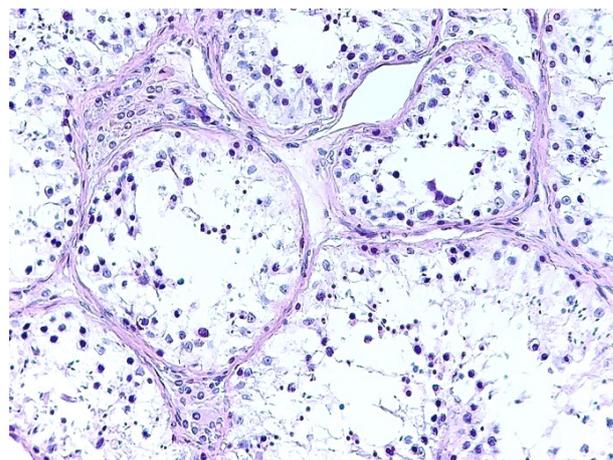
В образцах яичек пациентов I-ой группы (n=44) выявили ГО дольчатого строения с то-

тальной герминальной аплазией. Большинство атипичных клеток со светлой цитоплазмой и четкими границами, ядра многоугольные, с одним или несколькими ядрышками. Стромальный компонент представлен волокнистой соединительной тканью, формирующей перегородки. В опухоли и паратуморальной ткани обнаружили умеренную клеточную воспалительную инфильтрацию: скопление лимфоцитов, плазмочитов и других иммунокомпетентных клеток. Кроме того, наблюдали межклеточный отек, наличие микрокист и очагов коагуляционного некроза, особенно в белочной оболочке, где также присутствовала воспалительная инфильтрация. Во всех микропрепаратах признаков инвазии в кровеносные и лимфатические сосуды не обнаружили (Рисунок 1).

В образцах интактных яичек II-ой группы выявили нормальную гистоархитектонику с физиологическим сперматогенезом и единичными иммунокомпетентными клетками (Рис. 1).



А



Б

Рис. 1. А – Пациент Р., 37 лет. Семинома. Окраска: гематоксилин и эозин, увелич. ×200.

Рис. 1. Б – Мужчина А., 44 лет. Яичко, II-ой группы. Окраска: гематоксилин и эозин, увелич. ×200.

Fig. 1. А – Patient R., 37 years old. Seminoma. Staining: hematoxylin and eosin, magnification ×200.

Fig. 1. B – Male A., 44 years old. Testicle, group II. Staining: hematoxylin and eosin, magnification ×200.

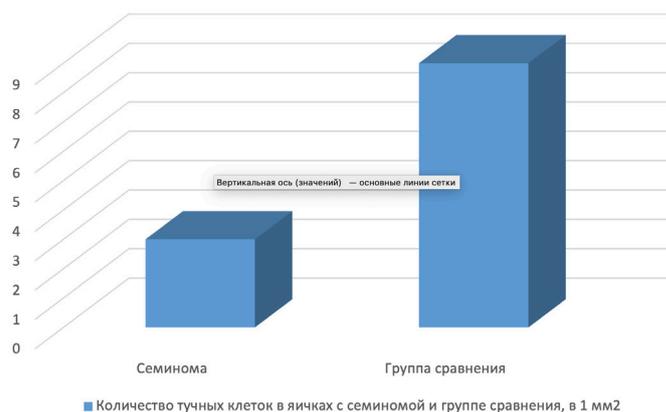
При гистохимическом исследовании яичек с семиномой, окрашенных толуидиновым синим, обнаружили снижение количества ТК в интерстициальной ткани в 3,3 раза по сравнению с образцами II-ой группы. Единичные ТК были с признаками слабой дегрануляции (рисунок 2, рисунок 3).

### ОБСУЖДЕНИЕ

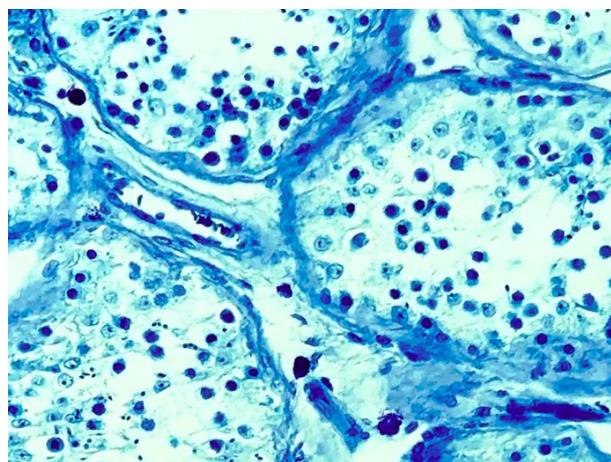
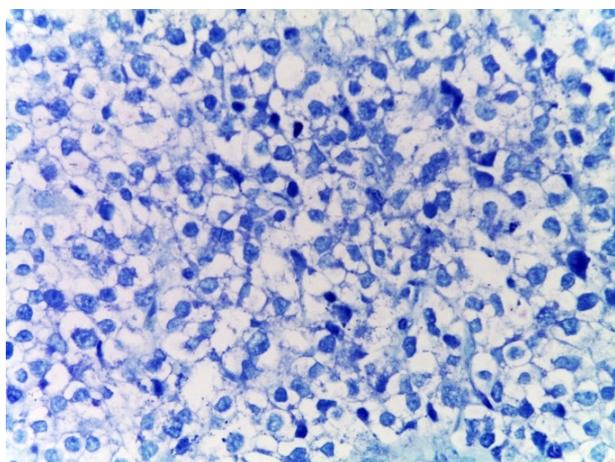
Семинома чаще всего встречается у молодых мужчин, в среднем, в возрасте 35–39 лет. Во всех образцах семиномы наблюдали типичное микро-

скопическое строение опухоли, преимущественно IA стадии злокачественного процесса. Это указывает на раннюю обрабатываемость, и благоприятный исход при лечении [13].

Особое внимание было посвящено изучению иммунного компонента микроокружения опухоли. Его свойства различаются в зависимости от стадии злокачественного новообразования, а также в регуляции генов [14, 15]. В некоторых исследованиях показано, что количественная и качественная характеристика элементов микроокружения может определять восприимчивость



**Рис. 2. Количество тучных клеток в яичках с семиномой и группе сравнения, в 1 мм<sup>2</sup>.**  
**Fig. 2. The number of mast cells in testicles with seminoma and the comparison group, in 1 mm<sup>2</sup>.**



**Рис. 2. А – Пациент М., 25 лет. Семинома. Окраска: толуидиновым синим, увелич. ×400.**  
**Рис. 2. Б – Мужчина Т., 31 лет. Яичко, II-ой группы. Окраска: толуидиновым синим, увелич. ×400.**  
**Fig. 2. A – Patient M., 25 years old. Seminoma. Staining: toluidine blue, magnification ×400.**  
**Fig. 2. B – Male T., 31 years old. Testicle, group II. Staining: toluidine blue, magnification ×400.**

опухоли к лечению, а положительный эффект закрепляется за счет усиления клеточного иммунного ответа [16].

Обеспечение протуморогенных или противоопухолевых эффектов связано с миграцией ТК в строго определенные локусы ЛТМ для селективного управления механизмами создания опухолевого микроокружения с индивидуальными характеристиками пространственного распределения иммунокомпетентных, атипичных и других клеток, предопределяющих как персонифицированные ступени эволюции опухоли, так и закономерности ответа на проводимую терапию.

Количество ТК при различных воспалительных/реактивных поражениях яичек, как правило увеличено. В то же время, количественная и качественная характеристика тучных клеток внутри опухолевого узла и в паратуморальной ткани,

как один из критериев прогноза является предметом дискуссии, особенно в системе «хозяин-неоплазия». ТК могут обладать как цитотоксическим действием для некоторых опухолей, так и способствовать росту и метастазированию. В образцах семином, практически у всех пациентов выявили уменьшение количества ТК по сравнению с интактными яичками. Данные изменения обнаружили другие авторы при раке шейки матки и ацинарной аденокарциномы предстательной железы. Напротив, доля ТК резко увеличена при плоскоклеточном раке пищевода, раке молочной железы, аденокарциноме легких, меланоцитарных опухолей, ЗНО головного мозга [17].

Возможным механизмом снижения ТК в семиномах является активация Fas-L и других биологических субстратов клеток Сертоли, обладающих высокой фагоцитарной активностью,

способных связываться со специфическими антигенами тучных клеток, что приводит к их утилизации. Однако, для подтверждения данной гипотезы необходимо проведение мультиплексного иммуногистохимического и молекулярно-генетического исследований.

Тем не менее, количественное и качественное значение ТК в семиноме можно рассматривать в качестве прогностического маркера опухоли, а также при проведении дифференциальной диагностики (между воспалительным процессом яичка и неоплазией)

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Семинома характеризуется снижением количества ТК по сравнению с интактными яичками, что не исключает возможность использования данного критерия в качестве прогностического маркера.

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

**Conflicts of interest.** The authors have no conflicts of interest to declare

### ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- McHugh D. J., Gleeson J. P., Feldman D. R. Testicular cancer in 2023: current status and recent progress. *CA Cancer J Clin.* 2024;74(2):167-186. doi:10.3322/caac.21819
- Bandak M., Jørgensen N., Juul A., Lauritsen J., Gundgaard Kier M., Mortensen M., Daugaard G. Preorchietomy Leydig Cell Dysfunction in Patients With Testicular Cancer. *Clin Genitourin Cancer.* 2017 Feb;15(1):e37-e43. doi: 10.1016/j.clgc.2016.07.006. Epub 2016 Jul 21. PMID: 27524512.
- Park J. S., Kim J., Elghiatty A., Ham W. S. Recent global trends in testicular cancer incidence and mortality. *Medicine (Baltimore).* 2018 Sep;97(37):e12390. doi: 10.1097/MD.00000000000012390.
- Vasdev N., Moon A., Thorpe A. Classification, epidemiology and therapies for testicular germ cell tumours. *Int J Dev Biol.* 2013;57(2-4):133-9. doi:10.1387/ijdb.130031nv. PMID: 23784823.
- Ferlay J., Colombet M., Soerjomataram I., Dyba T., Randi G., Bettio M., Gavin A., Visser O., Bray F. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. *Eur J Cancer.* 2018 Nov;103:356-387. doi: 10.1016/j.ejca.2018.07.005.
- Feldman D. R., Bosl G. J., Sheinfeld J., Motzer R. J. Medical treatment of advanced testicular cancer. *JAMA.* 2008 Feb 13;299(6):672-84. doi:10.1001/jama.299.6.672. PMID: 18270356
- McHugh D. J., Gleeson J. P., Feldman D. R. Testicular cancer in 2023: Current status and recent progress. *CA Cancer J Clin.* 2024 Mar-Apr;74(2):167-186. doi: 10.3322/caac.21819.
- Oldenburg J., Berney D. M., Bokemeyer C., Climent M. A., Daugaard G., Gietema J. A., De Giorgi U., Haugnes H. S., Huddart R. A., Leão R., Sohaib A., Gillessen S., Powles T. ESMO Guidelines Committee. EURACAN. Testicular seminoma and non-seminoma: ESMO-EURACAN Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2022 Apr;33(4):362-375. doi:10.1016/j.annonc.2022.01.002.
- Demyashkin G. A., Borovaya T. G., Andreeva Yu. Yu., Koryakin S. N., Vadyukhin M. A., Shekin V. I. Influence of platelets growth factors on spermatogenesis after electronic irradiation. *Russian Journal of Archive of Pathology.* 2022;84(2):20-28. (In Russ.) doi:10.17116/ptol20228402120.
- Demyashkin GA. Immunophenotypic features of proliferation and apoptosis of gametes in male rats after local irradiation. *Crimean Journal of Experimental and Clinical Medicine.* 2021;11(3):6-11. (In Russ.) doi: 10.37279/2224-6444-2021-11-3-6-11.
- Savelyeva AV, Medvedev KE. Seminoma subtypes differ in the organization and functional state of the immune microenvironment. *3 Biotech.* 2023 Mar;13(3):110. doi: 10.1007/s13205-023-03530-1. Epub 2023 Mar 2. PMID: 36875959; PMCID: PMC9981831.
- Medvedev KE, Acosta PH, Jia L, Grishin NV. Deep Learning for Subtypes Identification of Pure Seminoma of the Testis. *Clinical Pathology.* 2024;17. doi: 10.1177/2632010X241232302
- Gayer FA, Henkel M, Luft J, Reichardt SD, Fichtner A, Legler TJ, Reichardt, H.M. The Subtype Identity of Testicular Cancer Cells Determines Their Immunostimulatory Activity in a Coculture Model. *Cancers* 2023, 15, 2619. doi: 10.3390/cancers15092619
- Yazici S, Del Biondo D, Napodano G, Grillo M, Calace FP, Prezioso D, Crocetto F, Barone B. Risk Factors for Testicular Cancer: Environment, Genes and Infections-Is It All? *Medicina (Kaunas).* 2023 Apr 7;59(4):724. doi: 10.3390/medicina59040724. PMID: 37109682; PMCID: PMC10145700.
- Alonso-Crisostomo L, Trendell J, Ferrareso M, Bailey S, Ward D, Scurlock ZGL, Wenlock SC, Bastos CAP, Jugdaohsingh R, Faria NJ, Enright AJ, Scarpini CG, Coleman N, Murray MJ. Testicular germ cell tumour cells release microRNA-containing extracellular vesicles that induce phenotypic and genotypic changes in cells of the tumour microenvironment. *Int J Cancer.* 2024 Jan 15;154(2):372-388. doi: 10.1002/ijc.34697. Epub 2023 Aug 26. PMID: 37632231.
- Yao Y, Shen Y, Yao JC and Zuo X (2024), Editorial: New advancement in tumor

microenvironment remodeling and cancer therapy. Front. Cell Dev. Biol. 12:1384567. doi: 10.3389/fcell.2024.1384567

17. Kollur SM, Pattankar VL, Hag EI. Mast cells in testicular lesions. Upsala Journal of Medical Sciences, 2004 109(3), 239–246. doi: 10.3109/2000-1967-086

## АКТИВНАЯ КЛЕТОЧНАЯ МАССА И ЕЕ ЗНАЧЕНИЕ ДЛЯ ПРОГНОЗА ЦИРРОЗА ПЕЧЕНИ

Волошин И. А., Гаджихмедова А. Н., Жариков Ю. О.

Кафедра анатомии и гистологии человека Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), 125009, Моховая улица, д. 11, стр. 10, Москва, Россия

**Для корреспонденции:** Жариков Юрий Олегович, кандидат медицинских наук, доцент кафедры анатомии и гистологии человека Института клинической медицины имени Н. В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова (Сеченовский университет) Минздрава России, e-mail: dr\_zharikov@mail.ru

**For correspondence:** Zharikov Yury Olegovich, PhD, Associate Professor, Department of Human Anatomy and Histology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), e-mail: dr\_zharikov@mail.ru

### Информация об авторах:

Волошин И. А., <https://orcid.org/0009-0009-5108-6813>

Гаджихмедова А. Н., <https://orcid.org/0000-0003-2557-5647>

Жариков Ю. О., <https://orcid.org/0000-0001-9636-3807>

### РЕЗЮМЕ

Корректная оценка тяжести цирроза печени необходима для определения тактики лечения пациента, однако наиболее распространенные способы не учитывают компонентный состав тела. В данной статье был рассмотрен показатель активной клеточной массы в качестве прогностического фактора течения цирроза печени. Поиск литературы был произведен на английском и русском языках с помощью ресурсов PubMed, ResearchGate, eLibrary по следующим ключевым словам: цирроз печени, компонентный состав тела, прогноз. Хронологическая глубина поиска была выбрана с 2000 г. по 2024 г. Активная клеточная масса - показатель количества метаболически активных тканей, а именно скелетных мышц, нервной ткани и клеток органов, измеряется неинвазивным методом биоимпедансометрии, обладающим большей доступностью, чем используемые с той же целью КТ, МРТ и DEXA. Наиболее значимо поражение печени влияет на массу скелетных мышц, с высокой частотой развивается саркопения, ассоциированная с ухудшением качества жизни, увеличением частоты осложнений и неблагоприятных исходов. Восстановление мышечной массы коррелирует с улучшением качества жизни и исхода заболевания, однако затруднено последствиями цирроза и требует применения физических упражнений, фармакологических средств и особого питания.

**Ключевые слова:** цирроз печени, биоимпедансный анализ, активная клеточная масса, саркопения, мышечная масса

### ACTIVE CELL MASS AND ITS VALUE IN PROGNOSIS OF LIVER CIRRHOSIS

Voloshin I. A., Gadzhikhmedova A. N., Zharikov Yu. O.

I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

### SUMMARY

Accurate evaluation of liver cirrhosis severity is necessary for the establishment of a treatment plan, however the most widely used methods do not take body composition into account. In this article active cell mass has been investigated as a prognostic factor of liver cirrhosis severity. PubMed, ResearchGate and eLibrary were used to carry out the search in Russian and English languages with the following keywords: liver cirrhosis, bioimpedance, prognosis. The chronological depth of the search was from 2000 to 2024. Active cell mass characterizes the quantity of metabolically active tissues including skeletal muscle, nervous tissue and organ cells; it is measured using the method of electrical bioimpedance, which is noninvasive and more accessible than CT, MRT and DEXA, used for the same purpose. Liver failure affects skeletal muscle mass most significantly, leading to the development of sarcopenia, which is associated with decreased quality of life, increased rate of complications and adverse outcomes. Recovery of muscle mass correlates with better quality of life and disease outcomes, although complicated by whole-body effects of cirrhosis and requiring physical exercise, pharmacological and alimentary interventions.

**Key words:** liver cirrhosis, bioimpedance, active cell mass, sarcopenia, muscle mass.

Цирроз печени (ЦП) – хроническое заболевание, характеризующееся уменьшением количества функционирующей паренхимы печени и

разрастанием стромального компонента (фибротические изменения органа). Основными этиологическими факторами развития ЦП являются

чрезмерное употребление алкоголя, инфицирование вирусами гепатита В и С, а также метаболические нарушения, сопутствующие диабету 2 типа и ожирению [1].

Оценка степени тяжести течения цирроза печени необходима для определения лечебной тактики, контроля ее эффективности, для оценки риска развития осложнений, определения показаний для трансплантации печени. С этой целью используется ряд методов: Индекс Маддрей (ИМ) вычисляется с помощью показателей протромбинового времени и общего билирубина в плазме; баллы по шкале Глазго (ШГ) вычисляются с помощью показателей возраста, количества лейкоцитов, уровня мочевины, билирубина и МНО. ИМ и ШГ применяются только для прогноза болезней печени алкогольной этиологии [2]. MELD (Model for End-stage Liver Disease) рассчитывается с помощью параметров возраста, МНО, креатинина, уровня билирубина. Вариантом показателя MELD является MELD-Na, в расчете которого учитывается концентрация Na в плазме [3]. При прогнозе 28-дневной смертности ИМ и MELD показали высокую чувствительность и специфичность при пограничных значениях 52,8 и 19 соответственно [4]. Шкала Чайлд-Пью учитывает такие параметры как уровень сывороточного альбумина, протромбиновый индекс, общий билирубин, степень развития асцита и печеночной энцефалопатии [5]. Сывороточный уровень интерлейкина-6 может использоваться для диагностики различных стадий цирроза печени, включая компенсированную, субкомпенсированную и декомпенсированную [6]. Оценка наличия выраженного фиброза и цирроза печени при хроническом гепатите С возможна с помощью индекса APRI (AST to platelet ratio index) [7].

Однако вышеописанные шкалы и индексы имеют свои недостатки. Они не учитывают такие важные показатели как компоненты состава тела, в частности, активную клеточную массу (АКМ). АКМ включает в себя все клетки организма, кроме костей и жировых клеток и представляет собой более полный и комплексный показатель, который позволяет оценить состояние организма.

Таким образом, одним из перспективных показателей, рассматриваемых для прогноза течения цирроза печени, может служить активная клеточная масса тела. Наиболее доступным, простым в интерпретации и неинвазивным методом определения компонентного состава тела является биоимпедансометрия (БИА). С помощью БИА можно определить кроме активной клеточной массы (АКМ) такие параметры состава тела, как жировая масса тела (ЖМТ), тощая масса тела (ТМТ), основной обмен и прочие. Основным его недостатком является зависимость показаний от

общей гидратации организма (результаты измерений могут особенно заметно меняться при обезвоживании или избытке жидкости в организме) [8]. В данной работе мы рассмотрим значение АКМ как прогностического фактора течения цирроза печени.

АКМ – это величина, используемая для оценки содержания в организме метаболически активных белковых тканей [9]. Основными компонентами АКМ являются скелетные мышцы, клетки паренхимы внутренних органов и нервная ткань [10]. Рассмотрев влияние каждого из компонентов АКМ на течение цирроза печени, можно определить прогностическую значимость АКМ.

Клеточная масса вычисляется следующим образом:

1 - определяется масса внеклеточной жидкости (с помощью определения активного сопротивления – импеданса на постоянном токе или достаточно низкой частоте переменного тока), общая вода организма (с помощью импеданса на достаточно высокой частоте переменного тока, при которой ток стремится выровняться внутри и вне клеток);

2 - из массы общей воды вычитают массу внеклеточной воды, получая массу клеточной жидкости;

3 - так как гидратация тощей массы тела является практически постоянной за счет механизмов гомеостаза, безжировую массу тела находят, умножая общую воду организма на коэффициент гидратации тощей массы, равный  $\approx 0,737 \pm 0,036$ . Безжировая масса состоит из общей массы клеток, массы костей и массы внеклеточной жидкости [11];

4 - для определения клеточной массы используется показатель средней гидратации клеток, который равен 0,7.

Принцип, по которому вычисляется именно активная клеточная масса, в научных публикациях и документации, предоставленной производителями приборов, использующих метод биоимпедансометрии, не описывается. Для определения прогностического значения АКМ, рассмотрим основные ее компоненты и их изменения при ЦП.

#### *Скелетные мышцы*

Основной компонент АКМ – скелетные мышцы. У пациентов с ЦП в 23-60% случаев развивается саркопения - значительное уменьшение массы скелетных мышц [12]. Для диагностики саркопении может использоваться ряд методов: определение площади поперечного сечения либо всех мышц туловища, либо отдельной мышцы, например, большой поясничной, на уровне L3 [13], и миостеатоза с помощью КТ или МРТ, использование двойной энергетической рентгеновской абсорбциометрии (DEXA/DXA) для опре-

деления ТМТ и мышечной массы, определение компонентного состава тела и мышечной массы с помощью биоимпедансометрии. Наиболее точным методом является КТ, так как результаты всех остальных методов зависят от степени гидратации организма, которая может изменяться при ЦП. Пороговыми значениями для саркопении с учетом роста являются 52 / для мужчин и 39 / для женщин (где - площадь поперечного сечения мышц, - квадрат роста пациента в метрах) при использовании КТ [14], <7.0 кг/ для мужчин и <5.7 кг/ для женщин (где кг - мышечная масса, - квадрат роста пациента в метрах) при использовании биоимпедансометрии [15].

#### *Этиология саркопении при циррозе печени*

Саркопения возникает в результате длительного преобладания процессов катаболизма белков над их синтезом в скелетных мышцах. Потеря мышечной массы может происходить как самостоятельно (саркопения), так и вместе с жировой массой (кахексия). Регуляция мышечной массы контролируется рядом генов и факторов транскрипции, влияющих на синтез белков в миоцитах, задействование и дифференцировку клеток-сателлитов. Синтез белка стимулируется активацией mTOR через протеинкиназу B, такой эффект на клетку оказывает инсулин, инсулиноподобный фактор роста, циркулирующий тестостерон, физические упражнения и аминокислоты с разветвленными цепями (BCAAs), особенно лейцин [16]. Задействование неактивных клеток-сателлитов и их дифференцировка регулируется таким же образом. Обратный эффект на клетки-сателлиты имеет миостатин, принадлежащий к семейству трансформирующих факторов роста- $\beta$ , экспрессия которого стимулируется гипераммонием [17], употреблением больших доз алкоголя [18].

Катаболизм белков в мышечных клетках осуществляется тремя системами: убиквитин-протеосомальный путь, аутофагия и кальпаин  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимые цистеиновые протеазы. Основным является убиквитин-протеосомальный, но он не способен разрушать целые миофибриллы самостоятельно, поэтому данный этап деградации миофибрилл выполняют кальпаин-протеазы, которые представляют собой внелизосомальные  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимые сериновые протеазы. Регуляция кальпаинов обеспечивается увеличением концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в клетке и регуляторным белком кальпастатином - ингибитором кальпаинов. Аутофагия в мышечных клетках также участвует в разрушении внутриклеточных структур и белков, к ее активации приводят реактивные формы кислорода и голодание [19].

#### *Основные причины развития саркопении при циррозе*

1. Истощение, а именно недостаток субстрата для синтеза мышечных компонентов [20]. У больных циррозом наблюдается уменьшение потребляемых калорий из-за тошноты, вызванной повышенным уровнем провоспалительных медиаторов, абдоминальных болей, нарушенной моторики ЖКТ [21], ухудшенной усвояемости жиров и жирорастворимых витаминов вследствие уменьшения объема вырабатываемой желчи.

2. Уровень миостатина повышается при увеличении концентрации аммиака в крови, а также при снижении уровней тестостерона и инсулиноподобного фактора роста-1 [17].

3. После того, как запасы гликогена в печени истощаются, использование жиров и белков для глюконеогенеза в печени у пациентов с циррозом происходит гораздо быстрее, чем у здоровых людей. Это подтверждается снижением дыхательного коэффициента с 0,84 у контрольной группы до 0,63 у пациентов с циррозом [22]. В скелетных мышцах уменьшается концентрация аминокислот с разветвленными боковыми цепями, играющих важную роль как в восстановлении мышечных белков, так и в регуляции апоптоза, синтеза альбумина, изменения инсулинорезистентности, и эффективности иммунного ответа [23]. Дефицит аминокислот активирует комплексный ответ на стресс, выражающийся уменьшением синтеза белка и стимуляцией аутофагии для восстановления и поддержания уровней аминокислот [24].

4. Хроническое низкоинтенсивное воспаление, обусловленное нарушенным обезвреживанием эндотоксина, поступающего в печень из кишечника и в норме не выходящего в системный кровоток, и характеризующееся повышенным уровнем ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ФНО- $\alpha$ , С-реактивного белка [25], было связано с саркопенией [26], что обосновано активацией убиквитин-протеосомального пути [22].

#### *Влияние саркопении на течение цирроза печени*

Саркопения - важный фактор, влияющий на повышение смертности до и после пересадки печени, а также ассоциированный с повышенной частотой инфекций, печеночной энцефалопатии, ухудшением качества жизни пациента. Распространенность саркопении среди пациентов с ЦП оценивается в диапазоне от 40 до 70% [27]. Увеличение уровня миостатина в плазме крови связано с ухудшением показателей выживаемости, при этом уровень миостатина положительно коррелирует со степенью тяжести цирроза печени и служит показателем функционального резерва печени [28]. Саркопения ассоциирована со значительным уменьшением выживаемости больных с циррозом печени: 1-, 3- и 5-летняя выживаемость при наличии саркопении соста-

вила 76.6%, 64.3%, и 45.3%, а при ее отсутствии 93.4%, 82.0%, и 74.2% соответственно [29]. При этом, хоть саркопения и связана с повышенной смертностью, она не коррелирует со значениями шкал Чайлд-Пью и MELD, то есть со степенью поражения печени [30]. У мужчин с хроническими заболеваниями печени пониженный уровень общего и свободного тестостерона коррелирует с повышенной смертностью [31], при этом низкий уровень тестостерона приводит к потере мышечной массы [32]. Таким образом, саркопения может указывать на пониженный уровень тестостерона, и, соответственно, на неблагоприятный прогноз заболевания.

#### *Нервная ткань*

Частым осложнением цирроза печени является печеночная энцефалопатия. Основными звеньями ее патогенеза являются повышение уровня аммиака в крови из-за уменьшения количества утилизирующих аммиак в мочевины гепатоцитов или коллатерального тока крови по порто-кавальным анастомозам или искусственно созданным шунтам (например, трансъюгулярное внутрипеченочное портосистемное шунтирование), воздействие аммиака на возбуждение и торможение при взаимодействии между нейронами, биохимические процессы в нейронах, отвечающие за окисление глюкозы и соответственно продукцию энергии [33; 34].

Повышение уровня аммиака в крови приводит к изменению активности гена, ответственного за синтез глутаминсинтазы – фермента, который преобразует аммиак в глутамин из глутамата. В скелетных мышцах этот фермент активируется, увеличивая их способность утилизировать аммиак, в то время как в нервной ткани его активность снижается. Глутаминсинтаза в нервной ткани преимущественно содержится в астроцитах глии [34]. Нервная ткань не имеет эффективного способа защиты от воздействия повышенных концентраций аммиака [35]. Повреждаются в большей части именно глиальные клетки, что морфологически выражается астроцитозом Альцгеймера II типа, наблюдаемый в коре больших полушарий, базальных ядрах и мозжечке. При этом ядра астроцитов увеличены, деформированы [36]. Несмотря на действие ряда нейротоксических эффектов, смерть нейронов происходит в незначительных количествах из-за наличия компенсаторных защитных процессов [37]. Таким образом, количественные изменения нервной ткани влияют на показатель АКМ в незначительной степени.

#### *Коррекция АКМ*

Восстановление нормальных значений АКМ возможно через увеличение мышечной массы. Хотя после трансплантации печени симптомы

печеночной энцефалопатии, портальной гипертензии и асцита могут уменьшиться, саркопения может остаться на прежнем уровне или даже прогрессировать [38; 39].

При циррозе печени такие факторы, как повышенный уровень аммиака в крови, истощение и системное воспаление, затрудняют увеличение мышечной массы. Также он затрудняется с возрастом, развивается “сопротивление анаболизму”, связанное с уменьшением концентрации анаболических гормонов и эффективности белоксинтезирующих систем [40].

Для коррекции саркопении требуется многосторонний подход, включающий в себя особое питание [41], физические упражнения [42] и использование фармакологических средств.

В случае компенсированного цирроза целесообразно суточно употреблять в пищу 25-35 ккал/кг тощей массы тела и 1.2-1.5 г белка/кг массы тела, при декомпенсации стоит увеличить до 35-40 ккал/кг тощей массы тела и 1.5-2 г/кг массы тела соответственно [43, 44]. Приемы пищи должны быть достаточно частыми, чтобы избежать длительных периодов голодания. С этой целью рекомендовано принимать пищу поздно вечером и сразу же после пробуждения с утра. Высококалорийный завтрак, богатый белком, показал положительный эффект на когнитивные способности пациентов с циррозом [45]. Предпочтение стоит отдавать растительным источникам белка, так как животные белки богаты ароматическими аминокислотами, не метаболизируемыми скелетными мышцами, в то время как растительные белки богаты аминокислотами с разветвленными боковыми цепями [46]. При невозможности употребления необходимого количества белка через прием пищи возможно использование добавок с ВСАА [47].

С помощью физических упражнений возможно увеличить силу и размер мышц у пациентов с циррозом, после 12 недель по 3 тренировки в неделю у группы испытуемых наблюдалось увеличение среднего показателя клеточной массы, измеренной методом биоимпедансометрии, с 36.1 кг до 37.5 кг [48]. За 8 недель тренировок на выносливость у группы испытуемых увеличился средний показатель максимального потребления кислорода, коррелирующий с общей выживаемостью, с 1.98 л/мин до 2.35 л/мин [49]. За время проведения вышеупомянутых исследований не было выявлено неблагоприятных последствий физических упражнений, что указывает на возможную целесообразность применения упражнений больным циррозом печени. При этом, аэробные упражнения на выносливость показали большее улучшение качества жизни пациентов,

чем силовые упражнения с дополнительным весом [50].

Применяя упражнения для восстановления АКМ у больных циррозом печени необходимо учитывать повышенную восприимчивость таких пациентов к травмам, нагрузкам и стрессовым воздействиям. Во время физических упражнений и в период восстановления после них у пациентов с циррозом печени значительно увеличивается концентрация аммиака в крови, причиной этому является не повышенная продукция аммиака мышцами больных, а ухудшенная способность утилизировать его. Более интенсивные нагрузки приводят к большему подъему концентрации аммиака [51]. Помимо этого, во время физических упражнений повышается давление в портальной системе, что увеличивает риск развития кровотечения из варикозно расширенных вен пищевода, и уменьшается приток артериальной крови к печени за счет перераспределения кровотока к работающим мышцам [52]. Однако повышение портального давления предотвращается приемом  $\beta$ -блокаторов, например, пропранолола [53].

Использование фармакологических средств возможно для воздействия на ряд факторов, усложняющих восстановление мышечной массы. Компенсация низкого уровня тестостерона у пациентов мужского пола стимулировала увеличение тощей массы тела, минеральной плотности костей, гемоглобина без замеченных неблагоприятных последствий [54]. Возможно применение терапии гормоном роста, однако ее побочным эффектом является прогрессирование отеков и асцита [55]. Для снижения концентрации аммиака в крови, после которого наблюдается частичное обратное развитие саркопении [56], возможно применение лактулозы и рифаксимины, воздействующих на кишечный микробиом, являющийся источником значительной части аммиака в организме [57].

У пациентов, способных восстановить мышечную массу после трансюгулярного внутрипеченочного портосистемного шунтирования, смертность была значительно ниже (9,8%) по сравнению с пациентами, не способными восстановить мышечную массу (43,5%) [58].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, добавление АКМ в шкалы оценки прогноза при ЦП позволит более точно оценить состояние организма, риски осложнений у больных, а также поможет в разработке индивидуальных планов лечения и реабилитации.

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

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

## ЛИТЕРАТУРА

1. Huang D. Q., Terrault N. A., Tacke F., Glud L. L., Arrese M., Bugianesi E., Loomba R. Global epidemiology of cirrhosis aetiology, trends and predictions. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2023;20(6):388-398. doi:10.1038/s41575-023-00759-2.
2. Родина А. С., Шубина М. Э., Дуданова О. П. Сравнительная оценка клинического значения некоторых прогностических моделей при алкогольном циррозе печени. *Гастроэнтерология Санкт-Петербурга*. 2018;(2):21-26.
3. Acharya G., Kaushik R. M., Gupta R., Kaushik R. Child-Turcotte-Pugh Score, MELD Score and MELD-Na Score as Predictors of Short-Term Mortality among Patients with End-Stage Liver Disease in Northern India. *Inflammatory Intestinal Disease*. 2020;5(1):1-10. doi:10.1159/000503921.
4. Kadian M., Kakkar R., Dhar M., Kaushik R. M. Model for end-stage liver disease score versus Maddrey discriminant function score in assessing short-term outcome in alcoholic hepatitis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2014;29(3):581-588. doi:10.1111/jgh.12400
5. Child C. G., Turcotte J. G. Surgery and portal hypertension. Major problems in clinical surgery. 1964;1:1-85.
6. Патент РФ на изобретение № RU 2632101 С. Оpubл. 02.10.2017. Бюл. № 28. Булатова И. А., Долгих О. В., Падучева С. В., Щёктова А. П., Шелудько В. С. Способ диагностики степени тяжести цирроза печени смешанной этиологии. URL:<https://elibrary.ru/wmmprez> (Дата обращения: 12.08.2024).
7. Wai C. T., Greenson J. K., Fontana R. J., Kalbfleisch J. D., Marrero J. A., Conjeevaram H. S., Lok A. S. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2003;38(2):518-526. doi:10.1053/jhep.2003.50346.
8. Dutra D., Bertemes-Filho P. Extracting Parasite Effects of Electrical Bioimpedance Measurements. *Journal of Electrical Bioimpedance*. 2018;9(1):115-122. doi:10.2478/joeb-2018-0016.
9. Николаев Д. В., Смирнов А. В., Бобринская И. Г., Руднев С. Г. Биоимпедансный анализ состава тела человека. М.: Наука; 2009.
10. Гирш Я. В., Герасимчик О. А. Роль и место биоимпедансного анализа в оценке состава тела детей и подростков с различной массой тела. *Бюллетень сибирской медицины*. 2018;17(2):121-132. doi:10.20538/1682-0363-2018-2-121-132.
11. Dittmar M., Reber H. New equations for estimating body cell mass from bioimpedance parallel models in healthy older Germans. *American Journal of Physiology-Endocrinology*

and Metabolism. 2001;281(5):E1005-E1014. doi:10.1152/ajpendo.2001.281.5.E1005

12. Bunchorntavakul C., Reddy K. R. Review article: malnutrition/sarcopenia and frailty in patients with cirrhosis. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2020;51(1):64-77. doi:10.1111/apt.15571

13. Gu D. H., Kim M. Y., Seo Y. S., Kim S. G., Lee H. A., Kim T. H., Jung Y. K., Kandemir A., Kim J. H., An H., Yim H. J., Yeon J. E., Byun K. S., Um S.H. Clinical usefulness of psoas muscle thickness for the diagnosis of sarcopenia in patients with liver cirrhosis. *Clinical and Molecular Hepatology*. 2018;24(3):319-330. doi:10.3350/cmh.2017.0077

14. Chianca V., Albano D., Messina C., Gitto S., Ruffo G., Guarino S., Del Grande F., Sconfienza L. M. Sarcopenia: imaging assessment and clinical application. *Abdominal Radiology*. 2022;47(9):3205-3216. doi:10.1007/s00261-021-03294-3

15. Chen L. K., Woo J., Assantachai P., Auyeung T. W., Chou M. Y., Iijima K., Jang H. C., Kang L., Kim M., Kim S., Kojima T., Kuzuya M., Lee J. S. W., Lee S. Y., Lee W. J., Lee Y., Liang C. K., Lim J. Y., Lim W. S., Peng L. N., Sugimoto K., Tanaka T., Won C. W., Yamada M., Zhang T., Akishita M., Arai H. Asian Working Group for Sarcopenia: 2019 Consensus Update on Sarcopenia Diagnosis and Treatment. *Journal of the American Medical Directors Association*. 2020;21(3):300-307.e2. doi:10.1016/j.jamda.2019.12.012.

16. Drummond M. J., Dreyer H. C., Fry C. S., Glynn E. L., Rasmussen B. B. Nutritional and contractile regulation of human skeletal muscle protein synthesis and mTORC1 signaling. *Journal of Applied Physiology*. 2009;106(4):1374-1384. doi:10.1152/jappphysiol.91397.2008.

17. Qiu J., Thapaliya S., Runkana A., Yang Y., Tsien C., Mohan M. L., Narayanan A., Eghtesad B., Mozdziak P. E., McDonald C., Stark G. R., Welle S., Naga Prasad S. V., Dasarathy S. Hyperammonemia in cirrhosis induces transcriptional regulation of myostatin by an NF- $\kappa$ B-mediated mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(45):18162-18167. doi:10.1073/pnas.1317049110.

18. Thapaliya S., Runkana A., McMullen M. R., Nagy L. E., McDonald C., Naga Prasad S. V., Dasarathy S. Alcohol-induced autophagy contributes to loss in skeletal muscle mass. *Autophagy*. 2014;10(4):677-690. doi:10.4161/auto.27918.

19. Tipton K. D., Hamilton D. L., Gallagher I. J. Assessing the Role of Muscle Protein Breakdown in Response to Nutrition and Exercise in Humans. *Sports Medicine*. 2018;48(Suppl 1):53-64. doi:10.1007/s40279-017-0845-5.

20. Periyalwar P., Dasarathy S. Malnutrition in cirrhosis: contribution and consequences of

sarcopenia on metabolic and clinical responses. *Clinical Liver Disease*. 2012;16(1):95-131. doi:10.1016/j.cld.2011.12.009.

21. Tsiaousi E. T., Hatzitolios A. I., Trygonis S. K., Savopoulos C. G. Malnutrition in end stage liver disease: recommendations and nutritional support. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2008;23(4):527-533. doi:10.1111/j.1440-1746.2008.05369.x.

22. Sinclair M., Gow P. J., Grossmann M., Angus P. W. Review article: sarcopenia in cirrhosis - aetiology, implications and potential therapeutic interventions. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2016;43(7):765-777. doi:10.1111/apt.13549.

23. Tajiri K., Shimizu Y. Branched-chain amino acids in liver diseases. *World Journal of Gastroenterology*. 2013;19(43):7620-7629. doi:10.3748/wjg.v19.i43.7620.

24. Pakos-Zebrucka K., Koryga I., Mnich K., Ljujic M., Samali A., Gorman A. M. The integrated stress response. *EMBO reports*. 2016;17(10):1374-1395. doi:10.15252/embr.201642195.

25. Tilg H., Wilmer A., Vogel W., Herold M., Nölchen B., Judmaier G., Huber C. Serum levels of cytokines in chronic liver diseases. *Gastroenterology*. 1992;103(1):264-274. doi:10.1016/0016-5085(92)91122-k.

26. Beyer I., Mets T., Bautmans I. Chronic low-grade inflammation and age-related sarcopenia. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*. 2012;15(1):12-22. doi:10.1097/MCO.0b013e32834dd297.

27. Ebadi M., Bhanji R. A., Mazurak V. C., Montano-Loza A. J. Sarcopenia in cirrhosis: from pathogenesis to interventions. *Journal of Gastroenterology*. 2019;54(10):845-859. doi:10.1007/s00535-019-01605-6.

28. Nishikawa H., Enomoto H., Ishii A., Iwata Y., Miyamoto Y., Ishii N., Yuri Y., Hasegawa K., Nakano C., Nishimura T., Yoh K., Aizawa N., Sakai Y., Ikeda N., Takashima T., Takata R., Iijima H., Nishiguchi S. Elevated serum myostatin level is associated with worse survival in patients with liver cirrhosis. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*. 2017;8(6):915-925. doi:10.1002/jcsm.12212.

29. Tantai X., Liu Y., Yeo Y. H., Praktijnjo M., Mauro E., Hamaguchi Y., Engelmann C., Zhang P., Jeong J. Y., van Vugt J. L. A., Xiao H., Deng H., Gao X., Ye Q., Zhang J., Yang L., Cai Y., Liu Y., Liu N., Li Z., Han T., Kaido T., Sohn J. H., Strassburg C., Berg T., Trebicka J., Hsu Y. C., IJzermans J. N. M., Wang J., Su G. L., Ji F., Nguyen M.H. Effect of sarcopenia on survival in patients with cirrhosis: A meta-analysis. *Journal of Hepatology*. 2022;76(3):588-599. doi:10.1016/j.jhep.2021.11.006.

30. Montano-Loza A. J., Meza-Junco J., Prado C. M., Lieffers J. R., Baracos V. E., Bain V. G., Sawyer M. B. Muscle wasting is associated with mortality in patients with cirrhosis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2012;10(2):166-173.e1. doi:10.1016/j.cgh.2011.08.028.
31. Grossmann M., Hoermann R., Gani L., Chan I., Cheung A., Gow P. J., Li A., Zajac J. D., Angus P. Low testosterone levels as an independent predictor of mortality in men with chronic liver disease. *Clinical Endocrinology*. 2012;77(2):323-328. doi:10.1111/j.1365-2265.2012.04347.x.
32. Yuki A., Otsuka R., Kozakai R., Kitamura I., Okura T., Ando F., Shimokata H. Relationship between low free testosterone levels and loss of muscle mass. *Scientific Reports*. 2013;3:1818. doi:10.1038/srep01818
33. Lai J. C., Cooper A. J. Brain alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex: kinetic properties, regional distribution, and effects of inhibitors. *Journal of Neurochemistry*. 1986;47(5):1376-1386. doi:10.1111/j.1471-4159.1986.tb00768.x.
34. Butterworth R. F. Hepatic Encephalopathy in Cirrhosis: Pathology and Pathophysiology. *Drugs*. 2019;79(Suppl 1):17-21. doi:10.1007/s40265-018-1017-0.
35. Desjardins P., Rao K. V., Michalak A., Rose C., Butterworth R. F. Effect of portacaval anastomosis on glutamine synthetase protein and gene expression in brain, liver and skeletal muscle. *Metabolic Brain Disease*. 1999;14(4):273-280. doi:10.1023/a:1020741226752.
36. Butterworth R. F., Giguère J. F., Michaud J., Lavoie J., Layrargues G. P. Ammonia: key factor in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Neurochemical pathology*. 1987;6(1-2):1-12. doi:10.1007/BF02833598
37. Butterworth R. Neuronal cell death in hepatic encephalopathy. *Metabolic Brain Disease*. 2007;22(3-4):309-320. doi:10.1007/s11011-007-9072-3.
38. Tsien C., Garber A., Narayanan A., Shah S. N., Barnes D., Eghtesad B., Fung J., McCullough A. J., Dasarthy S. Post-liver transplantation sarcopenia in cirrhosis: a prospective evaluation. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2014;29(6):1250-1257. doi:10.1111/jgh.12524.
39. Dasarthy S. Posttransplant sarcopenia: an underrecognized early consequence of liver transplantation. *Digestive Diseases and Sciences*. 2013;58(11):3103-3111. doi:10.1007/s10620-013-2791-x.
40. Brook M. S., Wilkinson D. J., Mitchell W. K., Lund J. N., Phillips B. E., Szewczyk N. J., Greenhaff P. L., Smith K., Atherton P. J. Synchronous deficits in cumulative muscle protein synthesis and ribosomal biogenesis underlie age-related anabolic resistance to exercise in humans. *The Journal of Physiology*. 2016;594(24):7399-7417. doi:10.1113/JP272857.
41. Bohé J., Low A., Wolfe R. R., Rennie M. J. Human muscle protein synthesis is modulated by extracellular, not intramuscular amino acid availability: a dose-response study. *The Journal of Physiology*. 2003;552(Pt 1):315-324. doi:10.1113/jphysiol.2003.050674.
42. Phillips S. M., Tipton K. D., Aarsland A., Wolf S. E., Wolfe R. R. Mixed muscle protein synthesis and breakdown after resistance exercise in humans. *American Journal of Physiology*. 1997;273(1 Pt 1):E99-E107. doi:10.1152/ajpendo.1997.273.1.E99.
43. European Association for the Study of the Liver. Electronic address: easloffice@easloffice.eu; European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines on nutrition in chronic liver disease. *Journal of Hepatology*. 2019;70(1):172-193. doi:10.1016/j.jhep.2018.06.024.
44. Plauth M., Bernal W., Dasarthy S., Merli M., Plank L. D., Schütz T., Bischoff S. C. ESPEN guideline on clinical nutrition in liver disease. *Clinical Nutrition*. 2019;38(2):485-521. doi:10.1016/j.clnu.2018.12.022.
45. Vaisman N., Katzman H., Carmiel-Haggai M., Lusthaus M., Niv E. Breakfast improves cognitive function in cirrhotic patients with cognitive impairment. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2010;92(1):137-140. doi:10.3945/ajcn.2010.29211.
46. Uribe M., Márquez M. A., Garcia Ramos G., Ramos-Urbe M. H., Vargas F., Villalobos A., Ramos C. Treatment of chronic portal-systemic encephalopathy with vegetable and animal protein diets. A controlled crossover study. *Digestive Diseases and Sciences*. 1982;27(12):1109-1116. doi:10.1007/BF01391449.
47. Kitajima Y., Takahashi H., Akiyama T., Murayama K., Iwane S., Kuwashiro T., Tanaka K., Kawazoe S., Ono N., Eguchi T., Anzai K., Eguchi Y. Supplementation with branched-chain amino acids ameliorates hypoalbuminemia, prevents sarcopenia, and reduces fat accumulation in the skeletal muscles of patients with liver cirrhosis. *Journal of Gastroenterology*. 2018;53(3):427-437. doi:10.1007/s00535-017-1370-x.
48. Aamann L., Dam G., Borre M., Drljevic-Nielsen A., Overgaard K., Andersen H., Vilstrup H., Aagaard N. K. Resistance Training Increases Muscle Strength and Muscle Size in Patients With Liver Cirrhosis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2020;18(5):1179-1187.e6. doi:10.1016/j.cgh.2019.07.058.
49. Zenith L., Meena N., Ramadi A., Yavari M., Harvey A., Carbonneau M., Ma M., Abraldes J. G., Paterson I., Haykowsky M. J., Tandon P. Eight

weeks of exercise training increases aerobic capacity and muscle mass and reduces fatigue in patients with cirrhosis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2014;12(11):1920-6.e2. doi:10.1016/j.cgh.2014.04.016.

50. Allen S. L., Quinlan J. I., Dhaliwal A., Armstrong M. J., Elsharkawy A. M., Greig C. A., Lord J. M., Lavery G. G., Breen L. Sarcopenia in chronic liver disease: mechanisms and countermeasures. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2021;320(3):G241-G257. doi:10.1152/ajpgi.00373.2020.

51. Dietrich R., Bachmann C., Lauterburg B. H. Exercise-induced hyperammonemia in patients with compensated chronic liver disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 1990;25(4):329-334. doi:10.3109/00365529009095494.

52. García-Pagán J. C., Santos C., Barberá J. A., Luca A., Roca J., Rodríguez-Roisin R., Bosch J., Rodés J. Physical exercise increases portal pressure in patients with cirrhosis and portal hypertension. *Gastroenterology*. 1996;111(5):1300-1306. doi:10.1053/gast.1996.v111.pm8898644.

53. Bandi J. C., García-Pagán J. C., Escorsell A., François E., Moitinho E., Rodés J., Bosch J. Effects of propranolol on the hepatic hemodynamic response to physical exercise in patients with cirrhosis. *Hepatology*. 1998;28(3):677-682. doi:10.1002/hep.510280312.

54. Sinclair M., Grossmann M., Hoermann R., Angus P. W., Gow P. J. Testosterone therapy increases muscle mass in men with cirrhosis and low testosterone: A randomised controlled trial. *Journal of Hepatology*. 2016;65(5):906-913. doi:10.1016/j.jhep.2016.06.007.

55. Wallace J. D., Abbott-Johnson W. J., Crawford D. H., Barnard R., Potter J. M., Cuneo R. C. GH treatment in adults with chronic liver disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2002;87(6):2751-2759. doi:10.1210/jcem.87.6.8548.

56. Kumar A., Davuluri G., Silva R. N. E., Engelen M. P. K. J., Ten Have G. A. M., Prayson R., Deutz N. E. P., Dasarthy S. Ammonia lowering reverses sarcopenia of cirrhosis by restoring skeletal muscle proteostasis. *Hepatology*. 2017;65(6):2045-2058. doi:10.1002/hep.29107.

57. Bass N. M., Mullen K. D., Sanyal A., Poordad F., Neff G., Leevy C. B., Sigal S., Sheikh M. Y., Beavers K., Frederick T., Teperman L., Hillebrand D., Huang S., Merchant K., Shaw A., Bortey E., Forbes W. P. Rifaximin treatment in hepatic encephalopathy. *The New England Journal of Medicine*. 2010;362(12):1071-1081. doi:10.1056/NEJMoa0907893.

58. Tsien C., Shah S. N., McCullough A. J., Dasarthy S. Reversal of sarcopenia predicts survival after a transjugular intrahepatic portosystemic stent. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*. 2013;25(1):85-93. doi:10.1097/MEG.0b013e328359a759.

## REFERENCES

1. Huang D. Q., Terrault N. A., Tacke F., Glud L. L., Arrese M., Bugianesi E., Loomba R. Global epidemiology of cirrhosis aetiology, trends and predictions. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2023;20(6):388-398. doi:10.1038/s41575-023-00759-2.

2. Rodina A. S., Shubina M. E., Dudanova O. P. Comparative assessment of the clinical significance of some prognostic models in alcoholic cirrhosis of the liver. *Gastroenterology of St. Petersburg*. 2018; (2):21-26. (In Russ.).

3. Acharya G., Kaushik R. M., Gupta R., Kaushik R. Child-Turcotte-Pugh Score, MELD Score and MELD-Na Score as Predictors of Short-Term Mortality among Patients with End-Stage Liver Disease in Northern India. *Inflammatory Intestinal Disease*. 2020;5(1):1-10. doi:10.1159/000503921.

4. Kadian M., Kakkar R., Dhar M., Kaushik R. M. Model for end-stage liver disease score versus Maddrey discriminant function score in assessing short-term outcome in alcoholic hepatitis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2014;29(3):581-588. doi:10.1111/jgh.12400.

5. Child C. G., Turcotte J. G. Surgery and portal hypertension. Major problems in clinical surgery. 1964;1:1-85.

6. Patent RU No. 2632101 C. Publ. 02.10.2017. Byul. No. 28. Bulatova I.A., Dolgikh O.V., Paducheva S.V., Shchekotova A.P., Sheludko V.S. A method for diagnosing the severity of liver cirrhosis of mixed etiology. URL: <https://elibrary.ru/wnmpez> (Accessed: 08/12/2024). (In Russ.).

7. Wai C. T., Greenson J. K., Fontana R. J., Kalbfleisch J. D., Marrero J. A., Conjeevaram H. S., Lok A. S. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2003;38(2):518-526. doi:10.1053/jhep.2003.50346.

8. Dutra D., Bertemes-Filho P. Extracting Parasite Effects of Electrical Bioimpedance Measurements. *Journal of Electrical Bioimpedance*. 2018;9(1):115-122. doi:10.2478/joeb-2018-0016.

9. Nikolaev D.V., Smirnov A.V., Bobrinskaya I.G., Rudnev S.G. Bioimpedance analysis of human body composition. Moscow: Nauka; 2009. (In Russ.).

10. Girsh Ya. V., Gerasimchik O. A. The role and place of bioimpedance analysis in assessing the body composition of children and adolescents with

- different body weights. *Bulletin of Siberian medicine*. 2018; 17 (2): 121–132. doi:10.20538/1682-0363-2018-2-121-132. (In Russ.).
11. Dittmar M., Reber H. New equations for estimating body cell mass from bioimpedance parallel models in healthy older Germans. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2001;281(5):E1005-E1014. doi:10.1152/ajpendo.2001.281.5.E1005.
12. Bunchorntavakul C., Reddy K. R. Review article: malnutrition/sarcopenia and frailty in patients with cirrhosis. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2020;51(1):64-77. doi:10.1111/apt.15571.
13. Gu D. H., Kim M. Y., Seo Y. S., Kim S. G., Lee H. A., Kim T. H., Jung Y. K., Kandemir A., Kim J. H., An H., Yim H. J., Yeon J. E., Byun K. S., Um S.H. Clinical usefulness of psoas muscle thickness for the diagnosis of sarcopenia in patients with liver cirrhosis. *Clinical and Molecular Hepatology*. 2018;24(3):319-330. doi:10.3350/cmh.2017.0077.
14. Chianca V., Albano D., Messina C., Gitto S., Ruffo G., Guarino S., Del Grande F., Sconfienza L. M. Sarcopenia: imaging assessment and clinical application. *Abdominal Radiology*. 2022;47(9):3205-3216. doi:10.1007/s00261-021-03294-3.
15. Chen L. K., Woo J., Assantachai P., Auyeung T. W., Chou M. Y., Iijima K., Jang H. C., Kang L., Kim M., Kim S., Kojima T., Kuzuya M., Lee J. S. W., Lee S. Y., Lee W. J., Lee Y., Liang C. K., Lim J. Y., Lim W. S., Peng L. N., Sugimoto K., Tanaka T., Won C. W., Yamada M., Zhang T., Akishita M., Arai H. Asian Working Group for Sarcopenia: 2019 Consensus Update on Sarcopenia Diagnosis and Treatment. *Journal of the American Medical Directors Association*. 2020;21(3):300-307.e2. doi:10.1016/j.jamda.2019.12.012.
16. Drummond M. J., Dreyer H. C., Fry C. S., Glynn E. L., Rasmussen B. B. Nutritional and contractile regulation of human skeletal muscle protein synthesis and mTORC1 signaling. *Journal of Applied Physiology*. 2009;106(4):1374-1384. doi:10.1152/jappphysiol.91397.2008.
17. Qiu J., Thapaliya S., Runkana A., Yang Y., Tsien C., Mohan M. L., Narayanan A., Eghtesad B., Mozdziaik P. E., McDonald C., Stark G. R., Welle S., Naga Prasad S. V., Dasarathy S. Hyperammonemia in cirrhosis induces transcriptional regulation of myostatin by an NF- $\kappa$ B-mediated mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(45):18162-18167. doi:10.1073/pnas.1317049110.
18. Thapaliya S., Runkana A., McMullen M. R., Nagy L. E., McDonald C., Naga Prasad S. V., Dasarathy S. Alcohol-induced autophagy contributes to loss in skeletal muscle mass. *Autophagy*. 2014;10(4):677-690. doi:10.4161/auto.27918.
19. Tipton K. D., Hamilton D. L., Gallagher I. J. Assessing the Role of Muscle Protein Breakdown in Response to Nutrition and Exercise in Humans. *Sports Medicine*. 2018;48(Suppl 1):53-64. doi:10.1007/s40279-017-0845-5.
20. Periyalwar P., Dasarathy S. Malnutrition in cirrhosis: contribution and consequences of sarcopenia on metabolic and clinical responses. *Clinical Liver Disease*. 2012;16(1):95-131. doi:10.1016/j.cld.2011.12.009.
21. Tsiaousi E. T., Hatzitolios A. I., Trygonis S. K., Savopoulos C. G. Malnutrition in end stage liver disease: recommendations and nutritional support. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2008;23(4):527-533. doi:10.1111/j.1440-1746.2008.05369.x.
22. Sinclair M., Gow P. J., Grossmann M., Angus P. W. Review article: sarcopenia in cirrhosis - aetiology, implications and potential therapeutic interventions. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2016;43(7):765-777. doi:10.1111/apt.13549.
23. Tajiri K., Shimizu Y. Branched-chain amino acids in liver diseases. *World Journal of Gastroenterology*. 2013;19(43):7620-7629. doi:10.3748/wjg.v19.i43.7620.
24. Pakos-Zebrucka K., Koryga I., Mnich K., Ljujic M., Samali A., Gorman A. M. The integrated stress response. *EMBO reports*. 2016;17(10):1374-1395. doi:10.15252/embr.201642195.
25. Tilg H., Wilmer A., Vogel W., Herold M., Nölchen B., Judmaier G., Huber C. Serum levels of cytokines in chronic liver diseases. *Gastroenterology*. 1992;103(1):264-274. doi:10.1016/0016-5085(92)91122-k.
26. Beyer I., Mets T., Bautmans I. Chronic low-grade inflammation and age-related sarcopenia. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*. 2012;15(1):12-22. doi:10.1097/MCO.0b013e32834dd297.
27. Ebadi M., Bhanji R. A., Mazurak V. C., Montano-Loza A. J. Sarcopenia in cirrhosis: from pathogenesis to interventions. *Journal of Gastroenterology*. 2019;54(10):845-859. doi:10.1007/s00535-019-01605-6.
28. Nishikawa H., Enomoto H., Ishii A., Iwata Y., Miyamoto Y., Ishii N., Yuri Y., Hasegawa K., Nakano C., Nishimura T., Yoh K., Aizawa N., Sakai Y., Ikeda N., Takashima T., Takata R., Iijima H., Nishiguchi S. Elevated serum myostatin level is associated with worse survival in patients with liver cirrhosis. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*. 2017;8(6):915-925. doi:10.1002/jcsm.12212.
29. Tantai X., Liu Y., Yeo Y. H., Praktijnjo M., Mauro E., Hamaguchi Y., Engelmann C., Zhang P., Jeong J. Y., van Vugt J. L. A., Xiao H., Deng H., Gao X., Ye Q., Zhang J., Yang L., Cai Y., Liu Y., Liu N., Li

- Z., Han T., Kaido T., Sohn J. H., Strassburg C., Berg T., Trebicka J., Hsu Y. C., IJzermans J. N. M., Wang J., Su G. L., Ji F., Nguyen M.H. Effect of sarcopenia on survival in patients with cirrhosis: A meta-analysis. *Journal of Hepatology*. 2022;76(3):588-599. doi:10.1016/j.jhep.2021.11.006.
30. Montano-Loza A. J., Meza-Junco J., Prado C. M., Lieffers J. R., Baracos V. E., Bain V. G., Sawyer M. B. Muscle wasting is associated with mortality in patients with cirrhosis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2012;10(2):166-173.e1. doi:10.1016/j.cgh.2011.08.028.
31. Grossmann M., Hoermann R., Gani L., Chan I., Cheung A., Gow P. J., Li A., Zajac J. D., Angus P. Low testosterone levels as an independent predictor of mortality in men with chronic liver disease. *Clinical Endocrinology*. 2012;77(2):323-328. doi:10.1111/j.1365-2265.2012.04347.x.
32. Yuki A., Otsuka R., Kozakai R., Kitamura I., Okura T., Ando F., Shimokata H. Relationship between low free testosterone levels and loss of muscle mass. *Scientific Reports*. 2013;3:1818. doi:10.1038/srep01818.
33. Lai J. C., Cooper A. J. Brain alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex: kinetic properties, regional distribution, and effects of inhibitors. *Journal of Neurochemistry*. 1986;47(5):1376-1386. doi:10.1111/j.1471-4159.1986.tb00768.x.
34. Butterworth R. F. Hepatic Encephalopathy in Cirrhosis: Pathology and Pathophysiology. *Drugs*. 2019;79(Suppl 1):17-21. doi:10.1007/s40265-018-1017-0.
35. Desjardins P., Rao K. V., Michalak A., Rose C., Butterworth R. F. Effect of portacaval anastomosis on glutamine synthetase protein and gene expression in brain, liver and skeletal muscle. *Metabolic Brain Disease*. 1999;14(4):273-280. doi:10.1023/a:1020741226752.
36. Butterworth R. F., Giguère J. F., Michaud J., Lavoie J., Layrargues G. P. Ammonia: key factor in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Neurochemical pathology*. 1987;6(1-2):1-12. doi:10.1007/BF02833598.
37. Butterworth R. Neuronal cell death in hepatic encephalopathy. *Metabolic Brain Disease*. 2007;22(3-4):309-320. doi:10.1007/s11011-007-9072-3.
38. Tsien C., Garber A., Narayanan A., Shah S. N., Barnes D., Eghtesad B., Fung J., McCullough A. J., Dasarthy S. Post-liver transplantation sarcopenia in cirrhosis: a prospective evaluation. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2014;29(6):1250-1257. doi:10.1111/jgh.12524.
39. Dasarthy S. Posttransplant sarcopenia: an underrecognized early consequence of liver transplantation. *Digestive Diseases and Sciences*. 2013;58(11):3103-3111. doi:10.1007/s10620-013-2791-x.
40. Brook M. S., Wilkinson D. J., Mitchell W. K., Lund J. N., Phillips B. E., Szewczyk N. J., Greenhaff P. L., Smith K., Atherton P. J. Synchronous deficits in cumulative muscle protein synthesis and ribosomal biogenesis underlie age-related anabolic resistance to exercise in humans. *The Journal of Physiology*. 2016;594(24):7399-7417. doi:10.1113/JP272857.
41. Bohé J., Low A., Wolfe R. R., Rennie M. J. Human muscle protein synthesis is modulated by extracellular, not intramuscular amino acid availability: a dose-response study. *The Journal of Physiology*. 2003;552(Pt 1):315-324. doi:10.1113/jphysiol.2003.050674.
42. Phillips S. M., Tipton K. D., Aarsland A., Wolf S. E., Wolfe R. R. Mixed muscle protein synthesis and breakdown after resistance exercise in humans. *American Journal of Physiology*. 1997;273(1 Pt 1):E99-E107. doi:10.1152/ajpendo.1997.273.1.E99.
43. European Association for the Study of the Liver. Electronic address: easloffice@easloffice.eu; European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines on nutrition in chronic liver disease. *Journal of Hepatology*. 2019;70(1):172-193. doi:10.1016/j.jhep.2018.06.024.
44. Plauth M., Bernal W., Dasarthy S., Merli M., Plank L. D., Schütz T., Bischoff S. C. ESPEN guideline on clinical nutrition in liver disease. *Clinical Nutrition*. 2019;38(2):485-521. doi:10.1016/j.clnu.2018.12.022.
45. Vaisman N., Katzman H., Carmiel-Haggai M., Lusthaus M., Niv E. Breakfast improves cognitive function in cirrhotic patients with cognitive impairment. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2010;92(1):137-140. doi:10.3945/ajcn.2010.29211.
46. Uribe M., Márquez M. A., Garcia Ramos G., Ramos-Urbe M. H., Vargas F., Villalobos A., Ramos C. Treatment of chronic portal-systemic encephalopathy with vegetable and animal protein diets. A controlled crossover study. *Digestive Diseases and Sciences*. 1982;27(12):1109-1116. doi:10.1007/BF01391449.
47. Kitajima Y., Takahashi H., Akiyama T., Murayama K., Iwane S., Kuwashiro T., Tanaka K., Kawazoe S., Ono N., Eguchi T., Anzai K., Eguchi Y. Supplementation with branched-chain amino acids ameliorates hypoalbuminemia, prevents sarcopenia, and reduces fat accumulation in the skeletal muscles of patients with liver cirrhosis. *Journal of Gastroenterology*. 2018;53(3):427-437. doi:10.1007/s00535-017-1370-x.
48. Aamann L., Dam G., Borre M., Drljevic-Nielsen A., Overgaard K., Andersen H., Vilstrup H., Aagaard N. K. Resistance Training Increases

- Muscle Strength and Muscle Size in Patients With Liver Cirrhosis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2020;18(5):1179-1187.e6. doi:10.1016/j.cgh.2019.07.058.
49. Zenith L., Meena N., Ramadi A., Yavari M., Harvey A., Carbonneau M., Ma M., Abraldes J. G., Paterson I., Haykowsky M. J., Tandon P. Eight weeks of exercise training increases aerobic capacity and muscle mass and reduces fatigue in patients with cirrhosis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2014;12(11):1920-6.e2. doi:10.1016/j.cgh.2014.04.016.
50. Allen S. L., Quinlan J. I., Dhaliwal A., Armstrong M. J., Elsharkawy A. M., Greig C. A., Lord J. M., Lavery G. G., Breen L. Sarcopenia in chronic liver disease: mechanisms and countermeasures. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2021;320(3):G241-G257. doi:10.1152/ajpgi.00373.2020.
51. Dietrich R., Bachmann C., Lauterburg B. H. Exercise-induced hyperammonemia in patients with compensated chronic liver disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 1990;25(4):329-334. doi:10.3109/00365529009095494
52. García-Pagán J. C., Santos C., Barberá J. A., Luca A., Roca J., Rodríguez-Roisin R., Bosch J., Rodés J. Physical exercise increases portal pressure in patients with cirrhosis and portal hypertension. *Gastroenterology*. 1996;111(5):1300-1306. doi:10.1053/gast.1996.v111.pm8898644
53. Bandi J. C., García-Pagán J. C., Escorsell A., François E., Moitinho E., Rodés J., Bosch J. Effects of propranolol on the hepatic hemodynamic response to physical exercise in patients with cirrhosis. *Hepatology*. 1998;28(3):677-682. doi:10.1002/hep.510280312
54. Sinclair M., Grossmann M., Hoermann R., Angus P. W., Gow P. J. Testosterone therapy increases muscle mass in men with cirrhosis and low testosterone: A randomised controlled trial. *Journal of Hepatology*. 2016;65(5):906-913. doi:10.1016/j.jhep.2016.06.007
55. Wallace J. D., Abbott-Johnson W. J., Crawford D. H., Barnard R., Potter J. M., Cuneo R. C. GH treatment in adults with chronic liver disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled, cross-over study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2002;87(6):2751-2759. doi:10.1210/jcem.87.6.8548
56. Kumar A., Davuluri G., Silva R. N. E., Engelen M. P. K. J., Ten Have G. A. M., Prayson R., Deutz N. E. P., Dasarathy S. Ammonia lowering reverses sarcopenia of cirrhosis by restoring skeletal muscle proteostasis. *Hepatology*. 2017;65(6):2045-2058. doi:10.1002/hep.29107
57. Bass N. M., Mullen K. D., Sanyal A., Poordad F., Neff G., Leevy C. B., Sigal S., Sheikh M. Y., Beavers K., Frederick T., Teperman L., Hillebrand D., Huang S., Merchant K., Shaw A., Bortey E., Forbes W. P. Rifaximin treatment in hepatic encephalopathy. *The New England Journal of Medicine*. 2010;362(12):1071-1081. doi:10.1056/NEJMoa0907893
58. Tsien C., Shah S. N., McCullough A. J., Dasarathy S. Reversal of sarcopenia predicts survival after a transjugular intrahepatic portosystemic stent. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*. 2013;25(1):85-93. doi:10.1097/MEG.0b013e328359a759

Подписано в печать: 30.05.2024 г.

Дата выхода в свет:

Формат 60x84/8. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 8,5. Тираж 27 экземпляров.

Распространяется бесплатно.

Отпечатано в Издательском доме

ФГАОУ ВО «КФУ им. В. И. Вернадского»

Адрес издательства, типографии: 295051, г.Симферополь, бульвар Ленина 5/7