

ВЕСТНИК РОССИЙСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО МЕДИЦИНСКОГО УНИВЕРСИТЕТА

НАУЧНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ЖУРНАЛ РНИМУ ИМ. Н. И. ПИРОГОВА

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР Денис Ребриков, д. б. н., профессор

ЗАМЕСТИТЕЛЬ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА Александр Эттингер, д. м. н., профессор

РЕДАКТОРЫ Валентина Гейдебрехт, Надежда Тихомирова

ТЕХНИЧЕСКИЙ РЕДАКТОР Евгений Лукьянов

ПЕРЕВОДЧИКИ Наталия Усман

ДИЗАЙН И ВЕРСТКА Марины Дорониной

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

В. И. Аверин, д. м. н., профессор (Минск, Белоруссия)
Н. Н. Алипов, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
В. В. Белоусов, д. б. н., профессор (Москва, Россия)
М. Р. Богомилский, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
В. К. Божено, д. м. н., к. б. н., профессор (Москва, Россия)
Н. А. Былова, к. м. н., доцент (Москва, Россия)
Р. Р. Гайнетдинов, к. м. н. (Санкт-Петербург, Россия)
Г. Е. Гендлин, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Е. К. Гинтер, академик РАН, д. б. н. (Москва, Россия)
Л. Р. Горбачева, д. б. н., профессор (Москва, Россия)
И. Г. Гордеев, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
А. В. Гудков, PhD, DSc (Буффало, США)
Н. В. Гуляева, д. б. н., профессор (Москва, Россия)
Е. И. Гусев, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
В. Н. Даниленко, д. б. н., профессор (Москва, Россия)
Т. В. Зарубина, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
И. И. Затевахин, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
В. Е. Каган, профессор (Питтсбург, США)
Ю. Г. Кжышковска, д. б. н., профессор (Гейдельберг, Германия)
Б. А. Кобринский, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
А. В. Козлов, MD PhD (Вена, Австрия)
Ю. В. Котелевцев, к. х. н. (Москва, Россия)
М. А. Лебедев, PhD (Дарем, США)
Н. Е. Мантурова, д. м. н. (Москва, Россия)
О. Ю. Милушкина, д. м. н., доцент (Москва, Россия)
З. Б. Митупов, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
С. А. Мошковский, д. б. н., профессор (Москва, Россия)
Д. Б. Мунблит, MSc, PhD (Лондон, Великобритания)

В. В. Негребецкий, д. х. н., профессор (Москва, Россия)
А. А. Новиков, д. б. н. (Москва, Россия)
Ю. П. Пивоваров, д. м. н., академик РАН, профессор (Москва, Россия)
Н. В. Полунина, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Г. В. Порядин, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
А. Ю. Разумовский, член-корр., профессор (Москва, Россия)
О. Ю. Реброва, д. м. н. (Москва, Россия)
А. С. Рудой, д. м. н., профессор (Минск, Белоруссия)
А. К. Рылова, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Г. М. Савельева, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
В. Ф. Семиглазов, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Санкт-Петербург, Россия)
Н. А. Скоблина, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Т. А. Славянская, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
В. М. Смирнов, д. б. н., профессор (Москва, Россия)
А. Спаллоне, д. м. н., профессор (Рим, Италия)
В. И. Стародубов, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
В. А. Степанов, член-корр. РАН, д. б. н., профессор (Томск, Россия)
С. В. Сучков, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Х. П. Тахчиди, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Г. Е. Труфанов, д. м. н., профессор (Санкт-Петербург, Россия)
О. О. Фаворова, д. б. н., профессор (Москва, Россия)
М. Л. Филипенко, к. б. н. (Новосибирск, Россия)
Р. Н. Хазипов, д. м. н. (Марсель, Франция)
М. А. Чундокова, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Н. Л. Шимановский, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Л. Н. Шишкина, д. б. н. (Новосибирск, Россия)
Р. И. Якубовская, д. б. н., профессор (Москва, Россия)

ПОДАЧА РУКОПИСЕЙ <http://vestnikrgmu.ru/login>

ПЕРЕПИСКА С РЕДАКЦИЕЙ editor@vestnikrgmu.ru

СОТРУДНИЧЕСТВО manager@vestnikrgmu.ru

АДРЕС РЕДАКЦИИ ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997

Журнал включен в Scopus. CiteScore 2021: 0,5

Журнал включен в WoS. JCR 2021: 0,5

Индекс Хирша (h²) журнала по оценке Google Scholar: 8

Scopus®

WEB OF SCIENCE™

Google
scholar

ScImago Journal & Country Rank 2020: 0,14

Журнал включен в Перечень 31.01.2020 (№ 507)

Здесь находится открытый архив журнала

SJR
Scimago Journal & Country Rank



ВЫСШАЯ
АТТЕСТАЦИОННАЯ
КОМИССИЯ (ВАК)

CYBERLENINKA

DOI выпуска: 10.24075/vrgmu.2022-04

Свидетельство о регистрации средства массовой информации № 012769 от 29 июля 1994 г.

Учредитель и издатель — Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова (Москва, Россия)

Журнал распространяется по лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International www.creativecommons.org



Подписано в печать 31.08.2022
Тираж 100 экз. Отпечатано в типографии PrintFormula
www.print-formula.ru

BULLETIN OF RUSSIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY

BIOMEDICAL JOURNAL OF PIROGOV RUSSIAN NATIONAL RESEARCH MEDICAL UNIVERSITY

EDITOR-IN-CHIEF Denis Rebrikov, DSc, professor

DEPUTY EDITOR-IN-CHIEF Alexander Oettinger, DSc, professor

EDITORS Valentina Geidebrekht, Nadezda Tikhomirova

TECHNICAL EDITOR Evgeny Lukyanov

TRANSLATORS Natalia Usman

DESIGN AND LAYOUT Marina Doronina

EDITORIAL BOARD

Averin VI, DSc, professor (Minsk, Belarus)
Alipov NN, DSc, professor (Moscow, Russia)
Belousov VV, DSc, professor (Moscow, Russia)
Bogomilskiy MR, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Bozhenko VK, DSc, CSc, professor (Moscow, Russia)
Bylova NA, CSc, docent (Moscow, Russia)
Gainetdinov RR, CSc (Saint-Petersburg, Russia)
Gendlin GYe, DSc, professor (Moscow, Russia)
Ginter EK, member of RAS, DSc (Moscow, Russia)
Gorbacheva LR, DSc, professor (Moscow, Russia)
Gordeev IG, DSc, professor (Moscow, Russia)
Gudkov AV, PhD, DSc (Buffalo, USA)
Gulyaeva NV, DSc, professor (Moscow, Russia)
Gusev EI, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Danilenko VN, DSc, professor (Moscow, Russia)
Zarubina TV, DSc, professor (Moscow, Russia)
Zatevakhin II, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Kagan VE, professor (Pittsburgh, USA)
Kzyzhkowska YuG, DSc, professor (Heidelberg, Germany)
Kobriniskii BA, DSc, professor (Moscow, Russia)
Kozlov AV, MD PhD, (Vienna, Austria)
Kotelevtsev YuV, CSc (Moscow, Russia)
Lebedev MA, PhD (Darem, USA)
Manturova NE, DSc (Moscow, Russia)
Milushkina OYu, DSc, professor (Moscow, Russia)
Mitupov ZB, DSc, professor (Moscow, Russia)
Moshkovskii SA, DSc, professor (Moscow, Russia)
Munblit DB, MSc, PhD (London, Great Britain)

Negrebetsky VV, DSc, professor (Moscow, Russia)
Novikov AA, DSc (Moscow, Russia)
Pivovarov YuP, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Polunina NV, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Poryadin GV, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Razumovskii AYU, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Rebrova OYu, DSc (Moscow, Russia)
Rudoy AS, DSc, professor (Minsk, Belarus)
Rylova AK, DSc, professor (Moscow, Russia)
Savelieva GM, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Semiglazov VF, corr. member of RAS, DSc, professor (Saint-Petersburg, Russia)
Skoblina NA, DSc, professor (Moscow, Russia)
Slavyanskaya TA, DSc, professor (Moscow, Russia)
Smirnov VM, DSc, professor (Moscow, Russia)
Spallone A, DSc, professor (Rome, Italy)
Starodubov VI, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Stepanov VA, corr. member of RAS, DSc, professor (Tomsk, Russia)
Suchkov SV, DSc, professor (Moscow, Russia)
Takhchidi KhP, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Trufanov GE, DSc, professor (Saint-Petersburg, Russia)
Favorova OO, DSc, professor (Moscow, Russia)
Filipenko ML, CSc, leading researcher (Novosibirsk, Russia)
Khazipov RN, DSc (Marsel, France)
Chundukova MA, DSc, professor (Moscow, Russia)
Shimanovskii NL, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Shishkina LN, DSc, senior researcher (Novosibirsk, Russia)
Yakubovskaya RI, DSc, professor (Moscow, Russia)

SUBMISSION <http://vestnikrgmu.ru/login?lang=en>

CORRESPONDENCE editor@vestnikrgmu.ru

COLLABORATION manager@vestnikrgmu.ru

ADDRESS ul. Ostrovityanova, d. 1, Moscow, Russia, 117997

Indexed in Scopus. CiteScore 2021: 0.5

Scopus

SCImago Journal & Country Rank 2020: 0.14

SJR
Scimago Journal & Country Rank

Indexed in WoS. JCR 2021: 0.5

WEB OF SCIENCE

Listed in HAC 31.01.2020 (№ 507)



**ВЫСШАЯ
АТТЕСТАЦИОННАЯ
КОМИССИЯ (ВАК)**

Five-year h-index is 8

Google
scholar

Open access to archive

CYBERLENINKA

Issue DOI: 10.24075/brsmu.2022-04

The mass media registration certificate № 012769 issued on July 29, 1994

Founder and publisher is Pirogov Russian National Research Medical University (Moscow, Russia)

The journal is distributed under the terms of Creative Commons Attribution 4.0 International License www.creativecommons.org



Approved for print 31.08.2022
Circulation: 100 copies. Printed by PrintFormula
www.print-formula.ru

ОБЗОР	5
<hr/>	
<p>Новейшие достижения в диагностике гипоксической ишемической энцефалопатии новорожденных Н. Л. Стародубцева, Ч. М. Эльдаров, А. Р. Киртбая, Е. Н. Балашова, А. С. Грызунова, О. В. Ионов, В. В. Зубков, Д. Н. Силачев</p> <p>Recent advances in diagnostics of neonatal hypoxic ischemic encephalopathy Starodubtseva NL, Eldarov ChM, Kirtbaya AR, Balashova EN, Gryzunova AS, Ionov OV, Zubkov VV, Silachev DN</p>	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	19
<hr/>	
<p>Содержание CD4⁺-клеток с экспрессией эктонуклеотидаз CD39/CD73 у детей с воспалительными заболеваниями кишечника Т. В. Радыгина, С. В. Петричук, Д. Г. Купцова, А. С. Потапов, А. С. Илларионов, А. О. Анушенко, О. В. Курбатова, Е. Л. Семикина</p> <p>Content of CD4⁺ cells expressing CD39/CD73 ectonucleotidases in children with inflammatory bowel diseases Radygina TV, Petrichuk SV, Kuptsova DG, Potapov AS, Illarionov AS, Anushenko AO, Kurbatova OV, Semikina EL</p>	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	27
<hr/>	
<p>Уровень андрогенов в крови и фолликулярной жидкости у женщин с бесплодием и сниженным овариальным резервом в программах ВРТ А. А. Гависова, М. А. Шевцова, С. В. Киндышева, Н. Л. Стародубцева, В. Е. Франкевич, Т. А. Назаренко, Н. В. Долгушина</p> <p>Androgen levels in blood and follicular fluid of IVF patients with diminished ovarian reserve Gavisova AA, Shevtsova MA, Kindysheva SV, Starodubtseva NL, Frankevich VE, Nazarenko TA, Dolgushina NV</p>	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	35
<hr/>	
<p>Опыт применения Стэнфордской нейромодулирующей терапии у пациентов с терапевтически резистентной депрессией А. Г. Пойдашева, И. С. Бакулин, Д. О. Синицын, А. Х. Забирова, Н. А. Супонева, Н. В. Маслеников, Э. Э. Цукарзи, С. Н. Мосолов, М. А. Пирадов</p> <p>Experience of Stanford neuromodulation therapy in patients with treatment-resistant depression Poydashева AG, Bakulin IS, Sinitsyn DO, Zabirova AH, Suponeva NA, Maslennikov NV, Tsukarzi EE, Mosolov SN, Piradov MA</p>	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	43
<hr/>	
<p>Маркеры системного воспаления у крыс в модели диет-индуцированного метаболического синдрома Ю. Г. Бирулина, О. В. Воронкова, В. В. Иванов, Е. Е. Буйко, М. М. Щербактова, Н. А. Чернышов, Е. А. Мотлохова</p> <p>Systemic inflammation markers of diet-induced metabolic syndrome in rat model Birulina JG, Voronkova OV, Ivanov VV, Buyko EE, Shcherbakova MM, Chernyshov NA, Motlokhova EA</p>	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	50
<hr/>	
<p>EPOR/CD131-опосредованная ретинопротекция при ротенон-индуцированной нейротоксичности связана с увеличением экспрессии генов аутофагии В. О. Солдатов, М. В. Покровский, О. А. Пученкова, Н. С. Жунусов, А. М. Краюшкина, А. В. Гречина, М. О. Солдатова, К. Н. Лапин, О. Ю. Бушуева</p> <p>EPOR/CD131-mediated attenuation of rotenone-induced retinal degeneration is associated with upregulation of autophagy genes Soldatov VO, Pokrovsky MV, Puchenkova OA, Zhunusov NS, Krayushkina AM, Grechina AV, Soldatova MO, Lapin KN, Bushueva OYu</p>	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	57
<hr/>	
<p>Прогностическая значимость определения фторид-ионов в ротовой жидкости при остром перикороните В. Д. Вагнер, Е. А. Сарф, Л. В. Бельская, А. С. Коршунов, К. Н. Курятников, А. А. Бондарь, А. Д. Мелоян, К. А. Максименко, М. Н. Касий</p> <p>Prognostic significance of oral fluid fluoride measurement in acute pericoronitis Vagner VD, Sarf EA, Belskaya LV, Korshunov AS, Kuryatnikov KN, Bondar AA, Meloyan AD, Maksimenko KA, Kasiy MN</p>	

In silico-моделирование в оптимизации алгоритмов фармакокинетических исследований $[^{25}\text{Mg}^{2+}]$ порфирин-фуллереновых наночастиц
В. В. Фурсов, Д. И. Зинченко, Д. Д. Наместникова, Д. А. Кузнецов

In silico algorithm for optimization of pharmacokinetic studies of $[^{25}\text{Mg}^{2+}]$ porphyrin-fullerene nanoparticles
Fursov VV, Zinchenko DI, Namestnikova DD, Kuznetsov DA

НОВЕЙШИЕ ДОСТИЖЕНИЯ В ДИАГНОСТИКЕ ГИПОКСИЧЕСКОЙ ИШЕМИЧЕСКОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ НОВОРОЖДЕННЫХ

Н. Л. Стародубцева, Ч. М. Эльдаров, А. Р. Киртбая, Е. Н. Балашова, А. С. Грызунова, О. В. Ионов, В. В. Зубков, Д. Н. Силачев ✉

Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени В. И. Кулакова, Москва, Россия

Основной проблемой при гипоксической ишемической энцефалопатии новорожденных (ГИЭ) являются ранняя дифференциальная диагностика, прогнозирование и классификация заболевания, от результатов которых напрямую зависит дальнейший метод терапии, в частности, назначение терапевтической гипотермии. Существует прямая зависимость времени начала терапевтической гипотермии и долгосрочного неврологического исхода: чем раньше начата терапевтическая гипотермия, тем лучше прогноз для пациента. В обзоре проанализированы последние достижения в области системной биологии, направленные на раннюю дифференциальную диагностику ГИЭ в дополнение к клиническим: применение протеомных и метаболомных биомаркеров, а также внеклеточных везикул, для которых установлена связь с тяжестью ГИЭ и прогнозом исхода. Выявление селективных маркеров повреждения головного мозга у новорожденных в первые часы жизни затруднено из-за системного влияния гипоксии на весь организм. Особый интерес представляют метаболомные исследования крови новорожденных с использованием хромато-масс-спектрометрии, позволяющие анализировать сотни метаболитов на небольшом количестве биологического образца и определять паттерны, соответствующие повреждению мозга, что будет способствовать более точной и своевременной постановке диагноза ГИЭ для назначения терапевтической гипотермии.

Ключевые слова: гипоксическая ишемическая энцефалопатия новорожденных, диагностика, масс-спектрометрия, протеомика, метаболомика, липидомика

Финансирование: исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-15-00454, <https://rscf.ru/project/22-15-00454/>

Вклад авторов: Н. Л. Стародубцева, Ч. М. Эльдаров, А. Р. Киртбая, Е. Н. Балашова, А. С. Грызунова, О. В. Ионов, В. В. Зубков, Д. Н. Силачев — анализ литературных данных, написание и редактирование рукописи.

✉ **Для корреспонденции:** Денис Николаевич Силачев
ул. Академика Опарина, д. 4, г. Москва, 117997, Россия; d_silachev@oparina4.ru

Статья получена: 06.07.2022 **Статья принята к печати:** 20.07.2022 **Опубликована онлайн:** 29.07.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.038

RECENT ADVANCES IN DIAGNOSTICS OF NEONATAL HYPOXIC ISCHEMIC ENCEPHALOPATHY

Starodubtseva NL, Eldarov ChM, Kirtbaya AR, Balashova EN, Gryzunova AS, Ionov OV, Zubkov VV, Silachev DN ✉

Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia

The prognosis in neonatal hypoxic ischemic encephalopathy (HIE) depends on early differential diagnosis for justified administration of emergency therapeutic hypothermia. The moment of therapy initiation directly affects the long-term neurological outcome: the earlier the commencement, the better the prognosis. This review analyzes recent advances in systems biology that facilitate early differential diagnosis of HIE as a pivotal complement to clinical indicators. We discuss the possibilities of clinical translation for proteomic, metabolomic and extracellular vesicle patterns characteristic of HIE and correlations with severity and prognosis. Identification and use of selective biomarkers of brain damage in neonates during the first hours of life is hindered by systemic effects of hypoxia. Chromatography–mass spectrometry blood tests allow analyzing hundreds and thousands of metabolites in a small biological sample to identify characteristic signatures of brain damage. Clinical use of advanced analytical techniques will facilitate the accurate and timely diagnosis of HIE for enhanced management.

Keywords: neonatal hypoxic ischemic encephalopathy, diagnostics, mass-spectrometry, proteomics, metabolomics, lipidomics

Funding: the study was supported by the Russian Science Foundation grant number 22-15-00454; <https://rscf.ru/project/22-15-00454/>

Author contribution: Starodubtseva NL, Eldarov ChM, Kirtbaya AR, Balashova EN, Gryzunova AS, Ionov OV, Zubkov VV and Silachev DN — literature analysis, manuscript writing and editing.

✉ **Correspondence should be addressed:** Denis N. Silachev
Akademika Oparina, 4, Moscow, 117997, Russia; d_silachev@oparina4.ru

Received: 06.07.2022 **Accepted:** 20.07.2022 **Published online:** 29.07.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.038

Гипоксическая ишемическая энцефалопатия новорожденных

Гипоксическая ишемическая энцефалопатия новорожденных (ГИЭ) — одна из наиболее частых причин неонатальной смертности и инвалидности. Среди недоношенных детей (гестационный возраст < 28 недель) она составляет около 4–48 случаев на 1000 беременностей, однако их число начинает стремительно расти с уменьшением гестационного возраста [1–4]. На долю ГИЭ приходится 6–9% всех неонатальных смертей и 21–23% смертей доношенных детей. По данным литературы, до 10% новорожденных умирают после рождения, у 25% развиваются тяжелые неврологические нарушения: детский церебральный паралич, судороги, умственная отсталость, когнитивные нарушения и эпилепсия [5–9].

При лечении младенцев с данной патологией основная проблема связана с ее прогнозированием, выявлением и классификацией, поскольку все эти факторы влияют на стратегию дальнейшей терапии. Среди младенцев с признаками перинатальной асфиксии около 20% находятся в группе риска ГИЭ с энцефалопатиями различной степени тяжести, из них 40–50% будут подвержены риску инвалидизации, включая умственную отсталость, эпилептические приступы, нарушения зрения и слуха, а также возможен смертельный исход [10].

Терапевтическая гипотермия (ТГ) является доказанным, эффективным методом лечения ГИЭ, она улучшает выживаемость и долгосрочный прогноз у детей [11, 12]. Современные рекомендации по применению ТГ включают детей с ГИЭ от умеренной до тяжелой степени, начиная с 37-й недели гестации, исключая применение гипотермии

у детей с легкой степенью ГИЭ. По результатам национального исследования в Великобритании, 75% центров проводили ТГ младенцам с легкой степенью ГИЭ [13]. Проспективное исследование младенцев с легкой энцефалопатией (PRIME) показало, что у 52% младенцев с легкой формой ГИЭ при выписке были выявлены ранние аномальные изменения на эЭЭГ или судороги, патологическое МРТ головного мозга или неврологическая симптоматика [14]. При последующем наблюдении в среднем через 19 месяцев 16% младенцев имели инвалидность, а у 40% баллы по шкале Бейли III были < 85. Отмечено, что у детей с легкой ГИЭ, не проходивших курс ТГ, когнитивные исходы были такими же, как у детей с ГИЭ средней степени тяжести, которым не проводили ТГ. Систематический обзор результатов у младенцев с легкой степенью ГИЭ показал, что 25% ($n = 341$) имели патологический исход развития нервной системы [15–17].

Клиническая диагностика и прогнозирование развития ГИЭ

Ранняя и точная оценка тяжести ГИЭ остается одной из самых сложных задач неонатальной помощи. В неонатологии используют разнообразные клинические методы оценки морфофункционального состояния нервной системы для прогнозирования долгосрочных исходов, такие как нейровизуализация и нейрофизиологические инструменты и их комбинации [18–22]. Однако современные методы оценки риска повреждения головного мозга у новорожденного имеют ограничения, присущие первым часам жизни, и неопределенность в отношении тяжести продолжающегося повреждения головного мозга и возможного неврологического исхода сохраняется в этот ранний период [23, 24].

Наиболее доступные инструменты клинической оценки ГИЭ включают: оценку амплитудно-интегрированной электроэнцефалографии (аЭЭГ), нейровизуализацию и исследование мозгового кровотока [22, 24–27]. Многочисленные исследования показали, что около 80% судорог на ЭЭГ у новорожденных не имеют связи с клинической картиной и, следовательно, не могут быть идентифицированы без постоянного мониторинга ЭЭГ даже опытными клиницистами. Более того, нет различий в степени ГИЭ и частотой возникновения судорожной активности клинически или по данным ЭЭГ [28–30].

Амплитудно-интегрированные фоновые паттерны ЭЭГ при ГИЭ тесно коррелируют с неврологическим исходом [31]. Однако их прогностическая ценность зависит от того, как долго изменяются фоновые паттерны по отношению к ГИЭ, а большая прогностическая ценность неблагоприятных исходов у детей, которым проводили лечебную гипотермию, составляет 48–72 ч жизни [27]. Качественная оценка повреждения головного мозга, по данным МРТ-диагностики, в течение первых 48 ч может быть недооценена [32–34].

Выявлены различные факторы риска, влияющие на лечебный эффект ТГ у новорожденных с асфиксией, такие как тяжесть ГИЭ, отсроченное начало лечения, гипо- и гипергликемия, судороги, гипероксия и гипокания во время ТГ. Кроме того, несколько сопутствующих заболеваний могут влиять на нейропротекторную активность ТГ. Одним из хорошо известных факторов риска неблагоприятного неврологического исхода у новорожденных является перинатальный сепсис. Доказано, что ТГ не обладает нейропротективным

действием после сенсibilизированной воспалением гипоксически-ишемической энцефалопатии [35–39].

Метаболические нарушения редко вызывают ГИЭ [40]. Врожденные нарушения метаболизма (ВНМ) возникают в неонатальном периоде после нормального периода родов при отсутствии признаков перинатальной асфиксии. У новорожденных развиваются неврологические нарушения и признаки полиорганной недостаточности, которые могут иметь сходные клинические признаки с ГИЭ. Подробный семейный анамнез для установления таких факторов риска, как кровное родство родителей или гибель ребенка в анамнезе, имеет важное значение, так как большинство врожденных нарушений метаболизма имеют аутосомно-рецессивный тип наследования. Все новорожденные с риском ВНМ должны быть обследованы на предмет метаболических нарушений, так как у этих пациентов могут оказаться эффективными специфические методы лечения, а не гипотермия.

Еще одна категория детей с генетической причиной неврологических нарушений, схожих с ГИЭ, — это дети с неонатальными миопатиями и энцефалопатиями. У пациентов, унаследовавших миопатию (центронукулярную миопатию), при рождении выявляют мышечную гипотонию в сочетании с дыхательной недостаточностью и ранней смертью, что так же может имитировать ГИЭ [41]. Широкое применение методов полногеномного секвенирования позволило выявить целый ряд новых патологических мутаций, ассоциированных с нарушением функционирования центральной нервной системы, и имеющих схожие клинические признаки с ГИЭ, например в гене GNAO1 [42, 43]. Таким образом, ТГ показала свою эффективность не у всех пациентов с ГИЭ. Для ранней дифференциальной диагностики ГИЭ новорожденных могут быть применимы подходы по анализу метаболических изменений в крови новорожденных с использованием новых аналитических методов, в частности хромато-масс-спектрометрии. Данный метод позволяет идентифицировать сотни метаболитов в течение нескольких часов, что укладывается во временные рамки, необходимые для получения результатов анализов и принятия решения о назначении ТГ.

Новые подходы к диагностике ГИЭ: протеомные исследования

В последние годы постоянно повышается интерес к системной биологии — науке, которая объединяет несколько уровней информации для достижения более полного знания о биологической системе. Геномика, транскриптомика, протеомика и метаболомика входят в состав системной биологии и формируют так называемую группу «омикс»-наук. Активное развитие «омикс»-наук обусловлено значительным усовершенствованием экспериментальных технологий и, в первую очередь, успехами в области хроматографии, масс-спектрометрии и секвенирования. Технологии, используемые для создания «омикс»-платформ, представляют собой аналитические подходы для получения информации о входящих в состав биологического образца молекулах различного уровня организации: нуклеиновых кислотах, белках, метаболитах. Эти методы позволяют одновременно регистрировать количественное и качественное содержание нескольких тысяч соединений, создавая тем самым уникальный «отпечаток пальца», характеризующий текущее состояние организма. «Омикс»-науки комплементарны друг другу:

геномика показывает, что организм потенциально способен делать; транскриптомика, что он собирается делать; протеомика, что он делает, метаболомика отражает влияние окружающей среды на геном. В то время как гены и белки создают основу для того, что происходит в клетке, большая часть реальной активности происходит на уровне метаболитов. Более того, метаболизм может изменяться в зависимости от физиологического или патологического состояния клетки, ткани, органа или организма [44].

Развитие методов поиска биомаркеров различных, в том числе социально значимых, заболеваний, одно из наиболее динамично развивающихся направлений геномики, протеомики, метаболомики и инструментальных методов, в частности, ядерного магнитного резонанса (ЯМР), масс-спектрометрии (МС), высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС), иммуноферментными методами (ИФА). Об этом свидетельствует возрастающее из года в год число публикаций, специализированных конференций и специальных секций на отраслевых конференциях, посвященных данной проблеме.

Следует отметить, что клинические исследования в неонатальный период очень ограничены; при исследовании динамики молекулярного состава биологических жидкостей преимущественно обладают неинвазивные образцы (моча, стул), а также малоинвазивные образцы (кровь, сухое пятно крови). Некоторое количество таких образцов остается после рутинных клинических анализов, и их можно использовать для проведения дальнейших исследований, не прибегая к дополнительному отбору биологического материала.

В настоящее время в литературе представлены отдельные исследования крови, мочи и спинномозговой жидкости для поиска маркеров различных неонатальных патологий нервной системы, в частности ГИЭ [45]. Следует отметить, что сбор цереброспинальной жидкости (ликвора) является высокоинвазивным методом. Несмотря на наличие в нем специфичных нейрональных маркеров глиального фибриллярного кислого белка GFAP и S100B, эти маркеры не будут доступны в первые критические 6 ч послеродовой жизни и скорее будут подходить для прогнозирования исхода уже развившейся ГИЭ [46]. Предприняты также попытки анализа состава мочи, например, соотношения лактата и креатинина у младенцев с подозрением на патологию ГИЭ, но младенцы с врожденной неонатальной асфиксией, как правило, не выделяют мочу долгое время в связи с повреждением почек. Поэтому моча тоже не подходит для данной клинико-диагностической задачи [47].

В связи с этим, основное внимание исследований направлено на циркулирующие биомаркеры крови, по большей части белкового происхождения, а также нейрональные экзосомы и воспалительные цитокины и метаболиты. Последние достижения в области метаболомики, протеомики и транскриптомики тоже смещают фокус внимания исследователей, направленный на поиск целых молекулярных паттернов биологических молекул, которые бы позволили четко дифференцировать ГИЭ в течение первых 6 ч жизни младенцев от других сопутствующих повреждений (почек, миокарда), которые неизбежны при перинатальной асфиксии. Исследований, позволяющих охарактеризовать первый этап повреждения головного мозга (гипоксическую фазу или первые 6 ч после рождения), недостаточно, чтобы можно было сделать практические выводы для клинической медицины.

Поиск подобных маркеров затруднителен, что в первую очередь связано с процессом развития самой патологии. Гипоксические условия приводят к переключению клеток головного мозга на анаэробный метаболизм, к которому они, в особенности нейроны, не приспособлены. В итоге, довольно быстро в условиях стресса, эксайтотоксичности и накопления метаболитов происходит истощение всех энергетических запасов и как следствие — некротическая гибель клеток головного мозга, которая служит предтечей последующей воспалительной реакции. Наступающая после ишемии/гипоксии фаза реперфузии/реоксигенации способствует продукции активных форм кислорода, инициации апоптозных каскадов и воспалению. После этого наступает перманентная фаза хронического воспаления, которая лишь способствует прогрессии эксайтотоксичности, нарушению окислительного метаболизма, активации протеаз и каспаз, которые в итоге приводят к органическому повреждению головного мозга и нарушению функций [48]. Таким образом, в связи с динамически изменяющимся ходом развития молекулярно-биохимических каскадов, так же динамически изменяется и молекулярный состав крови новорожденных; кроме того многие потенциальные кандидатные молекулы «не попадают» во временной диапазон срочного принятия решения (6 ч). Например, упомянутые выше GFAP, S100B, а также специфичная нейрональная енолаза и основной белок миелина проявляют свои повышенные уровни в крови после первых 6 ч жизни (12–24 ч) [49–51]. Помимо этого, проблема усугубляется еще и тем, что неонатальную ГИЭ довольно сложно дифференцировать от сепсиса или врожденных метаболических заболеваний. Сепсис может сопровождать ГИЭ, изменяя клиническую картину. Важно отметить, что неправильная постановка диагноза и соответственно, назначение гипотермии может принести вред пациентам с энцефалопатиями неишемической природы [52]. Данный факт указывает на необходимость поиска маркеров повреждения головного мозга новорожденных, ассоциированных именно с ишемическим / гипоксическим генезом повреждения.

Еще одним препятствием для молекулярной диагностики ГИЭ служит специфичность самого маркера по отношению к повреждению нейрональных клеток. Предполагается, что большинством подобных маркеров должны относиться к белкам, поддерживающим структурную целостность нервной ткани, соответственно при нарушении проницаемости гематоэнцефалического барьера эти маркеры попадают сначала в спинномозговую жидкость, а затем уже в кровь [53]. Но очень часто ситуация складывается таким образом, что выявить специфичные маркеры на фоне общего воспалительного процесса или других дисфункций, сопутствующих при неонатальной асфиксии, становится довольно непростой задачей. Например, было показано, что в пуповинной крови 25 новорожденных с полным сроком беременности, но с развившейся тяжелой формой ГИЭ уровень креатинфосфокиназы мозгового типа (BT-CC) был повышен в несколько раз по сравнению со здоровыми детьми в течение первых 6 и 24 ч жизни [54]. BT-CC при этом не является ферментом, специфичным для повреждения головного мозга, а экспрессируется в большинстве тканей и может быть связан с повреждением других органов при асфиксии [55]. Еще одним кандидатом для использования был фермент убиквитин-С-терминальная гидролаза L1 — специфичный для цитоплазмы нейронов маркер апоптоза. Исследование крови, проведенное у 50 новорожденных (средний гестационный возраст — 37 недель), показало,

что уровень этого белка значительно повышается в первые 24 ч жизни новорожденных со средней и тяжелой формой ГИЭ, но обладает очень слабой корреляцией с изменениями, детектируемыми на МРТ уже на пятые сутки жизни и в более позднем периоде (1 год) [56]. Была также показана роль белка легкой цепи нейрофиламента (NFL): он повышался в крови новорожденных со средней и тяжелой формами ГИЭ, проходящих процедуру гипотермии. Первая временная точка была взята по достижении необходимой температуры в камере (18 °C). Несмотря на его высокую корреляцию с картиной МРТ в последующих временных интервалах, повышенный уровень этого белка в первые 6 ч жизни остается под вопросом, и его можно, скорее всего, рассматривать как прогностический признак дальнейшего исхода, а не постановки диагноза [57].

При нарушении целостности гематоэнцефалического барьера происходят активация эндотелиальных клеток и секреция ими неспецифических маркеров ангиогенеза, например васкулярного эндотелиального фактора роста (VEGF). Помимо того, VEGF могут также секретировать и астроциты с микроглией. Однако данные о его повышении в сыворотке крови у новорожденных с ГИЭ остаются под вопросом [58], и эта молекула не специфична для тканей головного мозга [59]. Примерно схоже ситуация выглядит с аденомодулином и секретонейрином, которые помимо нейрональной ткани секретируются эндокринной и нейроэндокринной системами, и их экспрессия значительно повышается в условиях гипоксии [60, 61].

Маркеры воспаления тоже могут иметь диагностическое значение, так как различные виды иммунных клеток и воспалительных факторов участвуют в повреждении и последующей регенерации после повреждения головного мозга. Было отмечено, что как у доношенных, так и недоношенных детей с неонатальной асфиксией уровни провоспалительных цитокинов в сыворотке крови, таких как TNF α , интерлейкины IL1 β , IL6, IL8, IL10 и ряд других, значительно возрастают [62]. Более того, по результатам исследования 20 новорожденных с ГИЭ с гестационным возрастом в среднем 36 недель, в случае развития асфиксии уровень цитокинов в плазме, особенности IL6 и IL8, значительно повышается в диапазоне 6–24 ч жизни и коррелирует с тяжестью течения ГИЭ [63]. Однако необходимо принимать во внимание, что воспалительному процессу при гипоксии-ишемии подвержена любая система организма, особенно у недоношенных детей. Вдобавок сами роды способны провоцировать воспалительную реакцию, а в условиях ГИЭ она может многократно усиливаться [64]. Исследования новорожденных (35 недель гестации) с ГИЭ, прошедших гипотермическую терапию (при 33 °C в течение 72 ч, начатую в первые 6 ч жизни) и без нее, показали важную роль IL6, IL1 β , IL8, TNF α и IL10 в развитии ГИЭ и их корреляцию с тяжестью исхода, однако говорить об их специфичности к повреждению тканей головного мозга говорить не приходится. Было показано, что в случае успешной гипотермической терапии уровни IL6, 8 и 10 значительно снижались к 36 ч жизни [65]. В другом исследовании также проводили оценку цитокинового профиля у новорожденных (36 месяцев гестации) с развившейся ГИЭ и помещенных в условия гипотермии в течение первых 6 ч жизни (72 ч 33,5 °C). Образцы крови, отобранные в первые 24 и 72 ч жизни, показали, что только IL6 оставался повышенным в течение 72 ч в группе с тяжелой формой ГИЭ [51].

Из выше проведенных исследований можно сделать следующие выводы: подход, основанный на

использовании уникальных единичных маркеров ГИЭ, не показал свою высокую прогностическую способность и целесообразность их дальнейшей трансляции в клиническую практику остается под вопросом. Можно предположить, что для дифференцированной диагностики ГИЭ необходим паттерн биологических молекул, которые могут быть выявлены с помощью омиксных технологий, в частности масс-спектрометрическими методами анализа различных классов молекул, включая белки, липиды, а также различные метаболиты.

На сегодняшний день в литературе представлено всего несколько работ, где авторы применяли протеомный анализ биологических жидкостей новорожденных с ГИЭ [66, 67]. В первом исследовании (2020 г.) было 12 пациентов по 4 новорожденных для каждой степени тяжести ГИЭ и группа контроля (16 детей). Все включенные в исследование пациенты имели гестационный срок 37 недель. Кровь объемом 3 мл отбирали до процедуры гипотермии в течение первых 5–7 ч жизни. Анализ крови проводили методом количественной масс-спектрометрии с применением изобарической метки для относительного количественного определения (iTRAQ). Дальнейший биоинформатический анализ показал, что пациенты с ГИЭ с различной степенью тяжести отличались от участников контрольной группы по уровню экспрессии белков. Наибольшие изменения были зарегистрированы в группе с максимальной степенью тяжести. Было обнаружено 133 уникальных белка, из них 14 были повышены в крови новорожденных. В основном данные белки участвовали в процессах клеточного повреждения, острого и хронического воспаления, входили в состав мембран внеклеточных органелл и экзосом. Результаты анализа методом Вестерн-блота и ПЦР смогли подтвердить изменения только в двух наиболее сильно изменяющихся белках: гаптоглобине и S100A8. Белок S100A8 участвует в ряде важных биологических процессов, включая воспаление и регуляцию гомеостаза кальция посредством взаимодействия с S100A9 [68]. Комплекс S100A8/A9 ингибирует продукцию провоспалительных цитокинов, подавляя чрезмерно выраженную воспалительную реакцию [69]. В свою очередь гаптоглобин, экспрессирующийся в тканях печени и мозга, является антиоксидантным белком, связывающим свободный гемоглобин, что защищает головной мозг от активных форм кислорода (АФК) при кровоизлияниях [70]. На сегодняшний день это пока единственная работа, в которой был применен протеомный анализ крови новорожденных с ГИЭ [67].

Еще рядом авторов в 2020 г. был проведен протеомный анализ цереброспинальной жидкости. У четырех новорожденных со сроком гестации 38–39 недель с ГИЭ и менее 5 баллов по Апгар при рождении брали образцы цереброспинальной жидкости в течение первых суток жизни. Масс-спектрометрический анализ методом iTRAQ выявил разницу в экспрессии 34 пептидов от 25 белков по сравнению с группой контроля. Биоинформатический анализ показал, что большинство из них связано с процессом укладки хроматина в ядре. Пептид белка теплового шока 90 α был наиболее выраженно снижен. Данный пептид вовлечен в процесс гибели клеток путем образования пор в мембране. Для подтверждения данной функциональной активности пептида было проведено исследование *in vitro*. Эксперименты на линии клеток PC12 продемонстрировали, что пептид белка теплового шока 90 α действительно защищает клетки от пироптоза, вызванного глюкозно-кислородной депривацией в течение

6 ч [66]. Подобный подход показывает возможность трансляции данных, полученных на животных и клеточных моделях повреждения головного мозга, с целью выявления специфических паттернов повреждения для внедрения в клиническую практику. Таким образом, удается анализировать непосредственно клиническую картину повреждения ткани головного мозга, не осложненную сопутствующими при асфиксии заболеваниями и функциональными нарушениями.

Клеточные модели для определения маркеров повреждения головного мозга

С целью упростить многофакторность системы у пациентов с ГИЭ и выявить специфические паттерны повреждения головного мозга применяют протеомный и метаболомный анализ на *in vivo* и *in vitro* моделях. Полученные данные можно учитывать при анализе и интерпретации клинических результатов исследования для поиска новых молекулярных паттернов повреждения головного мозга. Так, в одном из исследований проводили процедуру ишемии-гипоксии (перевязка сонной артерии и камера с гипоксическим газом 92% N₂ / 8% O₂ в течение 30 мин) семидневным мышам, а через 24 ч анализировали ткань головного мозга методом масс-спектрометрии. Уже через сутки после гипоксического воздействия была значительно снижена экспрессия белков-медиаторов реакции коллапса, которые активно участвуют в направлении роста аксонов и роста нейронов в целом [71]. Другие авторы проводили метаболомные исследования на новорожденных свиньях. Животных подвергали процедуре перевязки левой яремной вены и правой сонной артерии, после чего помещали в условия гипоксии для моделирования асфиксии (12–36 ч жизни). У животных отбирали кровь до процедуры, после гипоксии и через 120 мин после гипоксии в течение фазы реоксигенации. Результаты были получены методом жидкостной хроматографии с времяпролетной масс-спектрометрией: в плазме крови при гипоксии значительно увеличилось содержание метаболитов, свидетельствующих о переходе на анаэробный тип метаболизма, в частности, производных цитидина и уридина, свободных жирных кислот и холина. Авторы предлагают использовать эти соединения в качестве ранних маркеров диагностики ГИЭ у новорожденных [72]. В литературе описан ряд *in vitro* исследований на клеточных культурах, которые можно рассматривать как подходы по идентификации маркеров повреждения клеток головного мозга. Так, линию клеток гиппокампа мыши HT22 подвергали гипоксии в течение 17,5 ч с целью выяснить позитивное влияние низких концентраций глюкозы 0,69 мМ на эти клетки. Протеомный анализ методом высокоэффективной жидкостной хроматографии — тандемной масс-спектрометрии позволил выявить около 105 уникальных белков между экспериментальной группой и группой контроля (нормоксия). Дальнейший биоинформатический анализ показал, что большинство из этих 105 белков являются мишенями фактора HIF-1 α , индуцируемого гипоксией; несмотря на то, что сам белок определить в протеоме не удалось, его увеличение было обнаружено Вестерн-блоттом. Результатом индукции мишеней HIF-1 α стали запуск гликолиза, активация антиоксидантных систем, блокировка воспаления [73]. В другой работе тоже моделировали повреждения, возникающие в первичной культуре нейронов при ацидозе (pH = 6,2) в течение суток, с последующим протеомным

анализом. Обнаружено 69 «уникальных» белков, связанных с клеточной гибелью, нарушением синаптической пластичности и окислительным стрессом [74]. Подобные работы показывают применимость клеточных моделей для идентификации уникальных белков, ассоциированных с повреждением нейрональных клеток для решения дальнейших поисковых задач дифференциальной диагностики повреждения нервной системы.

Метаболомные подходы для диагностики и прогноза развития ГИЭ

Анализ метаболомного профиля крови может быть высокочувствительным методом при таких патологиях, как сепсис, ГИЭ, наследственные метаболические нарушения. Некоторые метаболиты-кандидаты могут служить многообещающими биомаркерами для ранней диагностики ГИЭ. Во всех исследованиях бактериального сепсиса у новорожденных были обнаружены изменения в метаболизме глюкозы и лактата, отражающие возможное перераспределение потребления глюкозы от митохондриального окислительного фосфорилирования к пути гликолиза и пентозофосфата, так же как признаки повышенного окислительного стресса и окисления жирных кислот при сепсисе [75].

Следует отметить еще один немаловажный факт — степень тяжести и динамика развития ГИЭ зависит и от гестационного возраста. В связи с этим не исключено, что в зависимости от времени гестации будут меняться протеомные и метаболомные профили как качественно, так и количественно [76, 77]. Показано, что метаболомный профиль специфичен для созревания доношенных и недоношенных новорожденных. Уровни продуктов метаболизма тирозина, биосинтеза триптофана, фенилаланина, цикла мочевины, метаболизма аргинина и пролина в моче демонстрируют значительную корреляцию с гестационным возрастом [78].

Успехи современной масс-спектрологии и ЯМР с недавнего времени позволяют применять метаболомный анализ и для ГИЭ, потому что стал возможным одномоментный анализ сотен метаболитов в единицу времени, что крайне важно при таких динамически развивающихся патологиях, как ГИЭ. Соответственно природе патологии, метаболомный анализ направлен на обнаружение доказательств клеточной гипоксии и нарушения обмена веществ. Таким образом, исследователи применяют три метаболомных подхода: целевой (т. е. анализ небольшого количества predetermined метаболитов), полуцелевой (анализ большого количества метаболитов) и нецелевой (анализ всех обнаруженных метаболитов). На данный момент в литературе описано около десятка исследований метаболома мочи и крови новорожденных с ГИЭ. При исследовании мочи использовали ЯМР- и MS-методы.

В одной из работ 2018 г. анализировали мочу, полученную от 10 новорожденных с ГИЭ, средним гестационным возрастом 38 недель и баллом по Апгар от 5 до 7. Мочу отбирали в течение первых 6 и 48 ч жизни во время гипотермии и после терапии (72 ч), а также после месяца жизни. Методом ЯМР было показано, что в образцах мочи погибших пациентов были значительно увеличены уровни лактата, миоинозитола и бетаин, а промежуточные продукты цикла Кребса (цитрат, α -кетоглутарат, сукцинат), ацетон, диметиламин (DMA), глютамин, пируват, N-ацетильные группы, аргинин и

ацетат, наоборот, снижены по сравнению с контролем (здоровые дети) [79]. В другой работе 2017 г. применяли метод ВЭЖХ-МС/МС для метаболомного анализа мочи у 13 новорожденных с ГИЭ со средним гестационным возрастом 36 недель и средним баллом по Апгар, равным 2–3. Мочу отбирали на 12 ч, третьи и девятые сутки жизни. Результаты показали достоверное снижение уровня ряда аминокислот (разветвленные лейцин, изолейцин, а также ароматические фенилаланин, тирозин, триптофан) и кинуренина и гиппуровой кислоты, повышение уровня ацилкарнитина между группой ГИЭ и контролем (здоровые дети) [80].

Были проведены и исследования метаболома крови новорожденных с ГИЭ. В одной из работ применен нецелевой метод метаболомного анализа пуповинной крови новорожденных с гестационным возрастом 36 недель и оценке по Апгар 6 баллов с неонатальной асфиксией без ГИЭ, асфиксией с признаками ГИЭ. Пуповинную кровь собирали в течение первых 20 мин после выхода плаценты во время родов. Показано, что между группой младенцев с неразвившейся ГИЭ и ГИЭ существовали статистически достоверные различия в уровне мелатонина, лейцина, кинуренина и 3-гидроксидодекановой кислоты. Были также выявлены маркеры степени тяжести ГИЭ, среди которых D-эритрозофосфат, ацетон, 3-оксотетрадекановая кислота и метилглутарилкарнитин. Биоинформатический анализ показал, что ГИЭ нарушает около 50 и 75% метаболитических путей триптофана и пиримидина [81]. В одном из недавних исследований (2021 г.) был применен метод газовой хроматографии с времяпролетной масс-спектрометрией. В данной работе у 24 новорожденных с тяжелой и среднетяжелой формами ГИЭ (гестационный возраст 35 недель, оценка по Апгар меньше 7 баллов) и у 24 новорожденных группы контроля сразу после рождения из бедренной артерии отбирали 2 мл крови с целью получения плазмы и ее дальнейшего метаболомного анализа. Обнаружено, что 52 метаболита в крови новорожденных четко дифференцируют ГИЭ от группы контроля. Эти метаболиты были связаны с путями, участвующими в метаболизме аминокислот, энергетическом обмене, биосинтезе нейротрансмиттеров, метаболизме пиримидина, регулировании HIF кислородом и передаче сигналов от рецепторов, связываемых с G-белком, GPCR. Около 14 метаболитов показали высокую прогностическую значимость для ГИЭ, в частности, аланин, глутаминовая кислота, глутамин, L-яблочная кислота, янтарная кислота, пировиноградная кислота и таурин. Помимо этого, α -кетоглутаровая кислота и гидроксилламин обладали высокой прогностической ценностью между средней и тяжелой формами ГИЭ, площадь под ROC-кривой составила 0,729 [82].

Обнаруженные в данных работах закономерности согласуются с нарушением энергетического обмена и повреждением митохондрий, которые иницируются при ГИЭ. Так, изменения в энергетических метаболитах, которые указывают на переход в сторону анаэробного метаболизма (увеличение лактата) и нарушение цикла Кребса, были наиболее часто встречаемыми результатами в описанных выше работах. Накопление лактата и промежуточных продуктов цикла Кребса (цитрата, альфа-кетоглутарата, сукцината и фумарата) можно объяснить истощением АТФ и дисфункцией дыхательной цепи. У новорожденных с тяжелой формой ГИЭ повышенный уровень сукцината также может коррелировать с уровнем тяжести энцефалопатии [83]. Стоит также отметить, что в

ряде работ неоднократно было отмечено, что и после 48 ч реанимации новорожденные с успешно купированной ГИЭ обладают особенностями метаболизма, отличающими их от здоровых детей [84]. Отдельно стоит упомянуть изменения в глутамине: он необходим для синтеза глутамата — основного медиатора возбуждения во время перинатальной травмы мозга [85]. В подобных работах часто обнаруживают и гипоксантин, который при взаимодействии с ксантиноксидазой образует АФК, губительные для тканей. Его увеличение считают основной характерной биохимической клинической чертой асфиксии [86].

Метаболомный анализ позволил выявить важную роль липидов в перинатальной асфиксии. У холина наиболее повышенный уровень среди липидных метаболитов во время ГИЭ [83]. Холин и его производные необходимы для структурной целостности клеточных мембран и передачи сигналов (фосфолипиды), нейротрансмиссии (синтез ацетилхолина), транспорта липидов (липопротеины) и метаболизма метильных групп (снижение гомоцистеина) [87]. Уровень инозитола, основного предшественника для синтеза фосфорилированных соединений-передатчиков сигналов, значительно увеличивается в крови после перинатальной асфиксии у новорожденных, однако не специфичен к повреждению нервной системы [46, 77]. Подводя итог, можно предположить, что наиболее эффективным и целесообразным направлением движения в области ранней диагностики ГИЭ будет поиск маркеров нейронального повреждения методом метаболомного анализа.

Внеклеточные везикулы в диагностике ГИЭ

В качестве альтернативы стоит рассмотреть и таргетный анализ внеклеточных везикул нейрональных клеток во время ГИЭ. Внеклеточные везикулы (ВВ) — это специализированные контейнеры клеточного происхождения, состоящие из цитоплазмы, окруженной фосфолипидной мембраной [88]. Известно, что ВВ принимают участие в большинстве важных биологических процессов: иммунной регуляции, модуляции воспаления, передаче сигналов от клетки к клетке, ангиогенезе и других. Известно, что ВВ, высвобождающиеся из нейронов, играют важную роль в поддержании их функциональной активности и развитии [89]. Было также показано, что в случае механического повреждения головного мозга или инсульта число нейрональных ВВ возрастает по сравнению с нормой [90, 91]. ВВ довольно привлекательны для исследователей в качестве диагностических маркеров. Они несут на своей поверхности трансмембранные белки, специфичные для клеток, их продуцирующих, что позволяет отбирать определенные классы ВВ для анализа. На поверхности нейрональных ВВ обнаружены молекулы адгезии, а также лиганды или рецепторы для таргетного взаимодействия с клетками-реципиентами (мишенями), которые, вероятно, могут играть важную роль в синаптогенезе и теоретически служить важными диагностическими маркерами нарушения развития нервной системы. Содержимое ВВ защищено от деградации, что указывает на их прогностическую ценность даже с течением времени или при условии длительного хранения [92–94].

На сегодняшний день в литературе описано всего несколько клинических исследований, где применяли нейрональные ВВ в качестве маркеров повреждения

при ГИЭ. В одной из работ (2015 г.) у 14 новорожденных (36 недель гестации, оценка по Апгар — 2–5 баллов) с ГИЭ и помещенных в условия гипотермии в течение первых 6 ч жизни отбирали венозную кровь (500 мкл) через 8, 10 и 14 ч после начала гипотермии. В данной работе был разработан метод получения нейрональных ВВ, суть которого в том, что 100 мкл плазмы, полученной из крови, инкубировали с коммерческим реагентом для осаждения экзосом (EXOQ; System Biosciences, Inc.; Mountainview, CA), после чего полученную суспензию инкубировали с биотинилизованными антителами на контактин-2 — специфичную молекулу адгезии, которые затем преципитировали с помощью стрептавидина. К сожалению, в работе не указана концентрация полученных ВВ, однако сами исследователи говорят о том, что их было довольно мало, так как в дальнейшем методом ИФА в полученных ВВ определяли содержание только четырех маркеров: синаптодопина, синаптофизина, нейрональной енолазы и митохондриальной цитохром-С-оксидазы. Оказалось, что лишь синаптоподин обладает диагностической ценностью, но его изменение отражает уже вторичное повреждение, возникающее после 6 ч жизни [95]. Следует отметить, что данная химическая модификация ВВ делает их не пригодными для масс-спектрометрического или метаболомного анализа. Более того, концентрация частиц в образце позволяет предположить, что измерения, вероятно, будут статистически недостоверны или пройдут на уровне фонового сигнала. В другой работе (2021 г.) этот же коллектив авторов провел исследование венозной крови 26 новорожденных с ГИЭ (гестационный возраст 39 недель, оценка по Апгар — 5 баллов) 0–6, 12, 24, 48 и 96 ч жизни. После выделения нейрональных ВВ способом, описанным выше, методом ИФА определяли нейрональные маркеры: синаптоподин, нейтрофильный, связанный с желатиназой, липокаллин (NGAL) и нейропептаксин-2 [96]. Известно, что NGAL хорошо коррелирует со степенью тяжести и исходом при гемморагическом инсульте, в то же время является маркером почечного повреждения [97, 98]. В свою очередь нейропептаксин-2 входит в систему возбуждающего синаптического окончания, связываясь с α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионат (или AMPA) глутаматным рецептором [99]. Как и в предыдущем исследовании, синаптоподин обладал прогностической значимостью и коррелировал со степенью повреждения

на МРТ при незначительном повреждении, но при более серьезной степени повреждения его прогностическая ценность была незначимой, тогда как чувствительность его в диапазоне от 0–12 часов падала с 40 до 18%. Была также обнаружена прогностическая ценность NGAL относительно картины МРТ при средней и высокой степени тяжести, но в диапазоне 12–48 ч. Попытки обнаружить корреляцию между снижением уровня синаптодопина и ростом NGAL во времени не имели успеха [96]. Остается неясным вопрос о возможности применения данного метода для ранней диагностики ГИЭ из-за крайне малого количества образца нейрональных ВВ.

Таким образом, показана перспективность использования методов, основанных на протеомном и метаболомном анализе, для диагностики ГИЭ на ранних этапах развития патологии. Однако требуются исследования, направленные на поиск специфичных для повреждения головного мозга молекулярных паттернов для дифференциальной диагностики в виду сочетания с повреждениями других органов при системном воздействии гипоксии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сохраняющиеся высокие показатели заболеваемости и смертности у новорожденных с ГИЭ свидетельствуют о необходимости поиска дополнительных методов диагностики, подтверждающих перенесенную гипоксию для своевременного принятия решения о проведении терапевтической гипотермии и для исключения пациентов со схожей клинической картиной, таких как ранний неонатальный сепсис, и детей с подозрением на наследственные болезни обмена. Существует прямая зависимость времени начала терапевтической гипотермии и долгосрочным неврологическим исходом: чем раньше начата терапевтическая гипотермия, тем лучший прогноз для пациента. Для ранней дифференциальной диагностики ГИЭ новорожденных могут быть применимы подходы к диагностике метаболических изменений в крови новорожденных с использованием хромато-масс-спектрометрии с выявлением метаболитов-кандидатов, имеющих высокий диагностический потенциал при ГИЭ. Использование дополнительных критериев, таких как метаболомные маркеры, будет способствовать более точной постановке диагноза ГИЭ и дифференциальной диагностике с другими заболеваниями.

Литература

- Manuck TA, Rice MM, Bailit JL, Grobman WA, Reddy UM, Wapner RJ, et al. Preterm neonatal morbidity and mortality by gestational age: a contemporary cohort. *Am J Obstet Gynecol*. 2016 [cited 2022 Jun 28]; 215 (1): 103.e1–103.e14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26772790/>.
- Thornberg E, Thiringer K, Odeback A, Milsom I. Birth asphyxia: incidence, clinical course and outcome in a Swedish population. *Acta Paediatrica*. 1995 [cited 2022 Jun 28]; 84 (8): 927–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7488819/>.
- Thorngren-Jerneck K, Herbst A. Low 5-minute Apgar score: a population-based register study of 1 million term births. *Obstet Gynecol*. 2001 [cited 2022 Jun 28]; 98 (1): 65–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11430958/>.
- Volpe JJ. Neonatal encephalopathy: an inadequate term for hypoxic-ischemic encephalopathy. *Ann Neurol*. 2012 [cited 2022 Jun 28]; 72 (2): 156–66. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22926849/>.
- Lawn J, Shibuya K, Stein C. No cry at birth: global estimates of intrapartum stillbirths and intrapartum-related neonatal deaths. *Bull World Health Organ*. 2005 [cited 2022 Jun 28]; 83 (6): 409. Available from: <https://pmc/articles/PMC2626256/?report=abstract>.
- Hoehn T, Hansmann G, Bühner C, Simbruner G, Gunn AJ, Yager J, et al. Therapeutic hypothermia in neonates. Review of current clinical data, ILCOR recommendations and suggestions for implementation in neonatal intensive care units. *Resuscitation*. 2008 [cited 2022 Jun 28]; 78 (1): 7–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18554560/>.
- Okerefor A, Allsop J, Counsell SJ, Fitzpatrick J, Azzopardi D, Rutherford MA, et al. Patterns of brain injury in neonates exposed to perinatal sentinel events. *Pediatrics*. 2008 [cited 2022 Jun 28]; 121 (5): 906–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18450893/>.
- Long M, Brandon DH. Induced hypothermia for neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Obstet Gynecol neonatal Nurs JOGNN*. 2007 [cited 2022 Jun 28]; 36 (3): 293–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17489937/>.

9. Pierrat V, Haouari N, Liska A, Thomas D, Subtil D, Truffert P. Prevalence, causes, and outcome at 2 years of age of newborn encephalopathy: population based study. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* Ed. 2005 [cited 2022 Jun 28];90(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15846019/>.
10. Lee ACC, Kozuki N, Blencowe H, Vos T, Bahalim A, Darmstadt GL, et al. Intrapartum-related neonatal encephalopathy incidence and impairment at regional and global levels for 2010 with trends from 1990. *Pediatr Res*. 2013 [cited 2022 Jun 28]; 74 Suppl 1(Suppl 1): 50–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24366463/>.
11. Wang LS, Cheng GQ, Zhou WH, Sun JQ, Cao Y, Shao XM. Meta-analysis of mild hypothermia for gestational age over 35-week newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Natl Med J China*. 2012 [cited 2022 Jun 28]; 92 (20): 1400–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22883198/>.
12. Edwards AD, Brocklehurst P, Gunn AJ, Halliday H, Juszczak E, Levene M, et al. Neurological outcomes at 18 months of age after moderate hypothermia for perinatal hypoxic ischaemic encephalopathy: synthesis and meta-analysis of trial data. *BMJ*. 2010 [cited 2022 Jun 28]; 340 (7743): 409. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20144981/>.
13. Oliveira V, Singhvi DP, Montaldo P, Lally PJ, Mendoza J, Manerkar S, et al. Therapeutic hypothermia in mild neonatal encephalopathy: a national survey of practice in the UK. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* Ed. 2018 [cited 2022 Jun 28]; 103 (4): F1–3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28942433/>.
14. Prempunpong C, Chalal LF, Garfinkle J, Shah B, Kalra V, Rollins N, et al. Prospective research on infants with mild encephalopathy: The PRIME study. *Journal of Perinatology. J Perinatol*. 2018 [cited 2022 Jun 28]; 38: 80–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29095433/>.
15. Chalal LF, Nguyen KA, Prempunpong C, Heyne R, Thayil S, Shankaran S, et al. Prospective research in infants with mild encephalopathy identified in the first six hours of life: neurodevelopmental outcomes at 18–22 months. *Pediatr Res*. 2018 [cited 2022 Jun 28]; 84 (6): 861–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30250303/>.
16. Murray DM, O'Connor CM, Anthony Ryan C, Korotchkova I, Boylan GB. Early EEG Grade and Outcome at 5 Years After Mild Neonatal Hypoxic Ischemic Encephalopathy. *Pediatrics*. 2016 [cited 2022 Jun 28]; 138 (4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27650049/>.
17. Conway JM, Walsh BH, Boylan GB, Murray DM. Mild hypoxic ischaemic encephalopathy and long term neurodevelopmental outcome — A systematic review. *Early Hum Dev*. 2018 [cited 2022 Jun 28]; 120: 80–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29496329/>.
18. Nanavati T, Seemaladinne N, Regier M, Yossuck P, Pergami P. Can We Predict Functional Outcome in Neonates with Hypoxic Ischemic Encephalopathy by the Combination of Neuroimaging and Electroencephalography? *Pediatr Neonatol*. 2015 [cited 2022 Jun 28]; 56 (5): 307–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25862075/>.
19. Polat M, Şimşek A, Tansuğ N, Sezer RG, Özkol M, Başpınar P, et al. Prediction of neurodevelopmental outcome in term neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Eur J Paediatr Neurol*. 2013 [cited 2022 Jun 28]; 17 (3): 288–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23231917/>.
20. Shellhaas RA, Kushwaha JS, Plegue MA, Selewski DT, Barks JDE. An Evaluation of Cerebral and Systemic Predictors of 18-Month Outcomes for Neonates With Hypoxic Ischemic Encephalopathy. *J Child Neurol*. 2015 [cited 2022 Jun 28]; 30 (11): 1526–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25724376/>.
21. Chang T, Du Plessis A. Neurodiagnostic techniques in neonatal critical care. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2012 [cited 2022 Jun 29]; 12 (2): 145–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22318538/>.
22. Van Laerehoven H, De Haan TR, Offringa M, Post B, Van Der Lee JH. Prognostic tests in term neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy: a systematic review. *Pediatrics*. 2013 [cited 2022 Jun 29]; 131 (1): 88–98. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23248219/>.
23. Rasmussen LA, Cascio MA, Ferrand A, Shevell M, Racine E. The complexity of physicians' understanding and management of prognostic uncertainty in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Perinatol*. 2019 [cited 2022 Jun 29]; 39 (2): 278–85. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30568164/>.
24. Natarajan N, Pardo AC. Challenges in neurologic prognostication after neonatal brain injury. *Semin Perinatol*. 2017 [cited 2022 Jun 29]; 41 (2): 117–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28139254/>.
25. Merchant N, Azzopardi D. Early predictors of outcome in infants treated with hypothermia for hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Dev Med Child Neurol*. 2015 [cited 2022 Jun 29]; 57 (S3): 8–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25800487/>.
26. Merhar SL, Chau V. Neuroimaging and Other Neurodiagnostic Tests in Neonatal Encephalopathy. *Clin Perinatol*. 2016 [cited 2022 Jun 29]; 43 (3): 511–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27524451/>.
27. Del Río R, Ochoa C, Alarcon A, Arnáez J, Blanco D, García-Alix A. Amplitude integrated electroencephalogram as a prognostic tool in neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy: A systematic review. *PLoS One*. 2016 [cited 2022 Jun 29]; 11 (11). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27802300/>.
28. Mizrahi EM. Neonatal seizures and neonatal epileptic syndromes. *Neurol Clin*. 2001 [cited 2022 Jun 29]; 19 (2): 427–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11358751/>.
29. Murray DM, Boylan GB, Ali I, Ryan CA, Murphy BP, Connolly S. Defining the gap between electrographic seizure burden, clinical expression and staff recognition of neonatal seizures. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* Ed. 2008 [cited 2022 Jun 29]; 93 (3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17626147/>.
30. Clancy RR, Legido A, Lewis D. Occult neonatal seizures. *Epilepsia*. 1988 [cited 2022 Jun 29]; 29 (3): 256–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3371282/>.
31. Weeke LC, Boylan GB, Pressler RM, Hallberg B, Blennow M, Toet MC, et al. Role of EEG background activity, seizure burden and MRI in predicting neurodevelopmental outcome in full-term infants with hypoxic-ischaemic encephalopathy in the era of therapeutic hypothermia. *Eur J Paediatr Neurol*. 2016 [cited 2022 Jun 28]; 20 (6): 855–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27370316/>.
32. Gunn AJ, Wyatt JS, Whitelaw A, Barks J, Azzopardi D, Ballard R, et al. Therapeutic hypothermia changes the prognostic value of clinical evaluation of neonatal encephalopathy. *J Pediatr*. 2008 [cited 2022 Jun 29]; 152 (1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18154900/>.
33. Boudes E, Tan X, Saint-Martin C, Shevell M, Wintermark P. MRI obtained during versus after hypothermia in asphyxiated newborns. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* Ed. 2015 [cited 2022 Jun 29]; 100 (3): F238–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25605620/>.
34. Bonifacio SL, deVries LS, Groenendaal F. Impact of hypothermia on predictors of poor outcome: how do we decide to redirect care? *Semin Fetal Neonatal Med*. 2015 [cited 2022 Jun 29]; 20 (2): 122–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25577654/>.
35. Thoresen M, Tooley J, Liu X, Jary S, Fleming P, Luyt K, et al. Time is brain: starting therapeutic hypothermia within three hours after birth improves motor outcome in asphyxiated newborns. *Neonatology*. 2013 [cited 2022 Jun 29]; 104 (3): 228–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24030160/>.
36. Basu SK, Kaiser JR, Guffey D, Minard CG, Guillet R, Gunn AJ. Hypoglycaemia and hyperglycaemia are associated with unfavourable outcome in infants with hypoxic ischaemic encephalopathy: A post hoc analysis of the CoolCap Study. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* Ed. 2016 [cited 2022 Jun 29]; 101 (2): F149–55. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26283669/>.
37. Shah DK, Wusthoff CJ, Clarke P, Wyatt JS, Ramaiah SM, Dias RJ, et al. Electrographic seizures are associated with brain injury in newborns undergoing therapeutic hypothermia. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* Ed. 2014 [cited 2022 Jun 29]; 99 (3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24443407/>.

38. Sabir H, Jary S, Tooley J, Liu X, Thoresen M. Increased inspired oxygen in the first hours of life is associated with adverse outcome in newborns treated for perinatal asphyxia with therapeutic hypothermia. *J Pediatr*. 2012 [cited 2022 Jun 29]; 161 (3): 409–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22521111/>.
39. Osredkar D, Thoresen M, Maes E, Flatebø T, Elstad M, Sabir H. Hypothermia is not neuroprotective after infection-sensitized neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Resuscitation*. 2014 [cited 2022 Jun 29]; 85 (4): 567–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24361672/>.
40. Uziel G, Ghezzi D, Zeviani M. Infantile mitochondrial encephalopathy. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2011 [cited 2022 Jun 29]; 16: 205–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21620787/>.
41. Bruyland M, Liebaers I, Sacre L, Vandeplass Y, De Meirleir L, Martin JJ. Neonatal myotubular myopathy with a probable X-linked inheritance: observations on a new family with a review of the literature. *J Neurol*. 1984 [cited 2022 Jun 29]; 231 (4): 220–2. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6512577/>.
42. Danti FR, Galosi S, Romani M, Montomoli M, Carss KJ, Lucy Raymond F, et al. GNAO1 encephalopathy: Broadening the phenotype and evaluating treatment and outcome. *Neurol Genet*. 2017 [cited 2022 Jul 4]; 3 (2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28357411/>.
43. Solis GP, Kozhanova TV, Koval A, Zhilina SS, Mescheryakova TI, Abramov AA, et al. Pediatric Encephalopathy: Clinical, Biochemical and Cellular Insights into the Role of Gln52 of GNAO1 and GNAI1 for the Dominant Disease. *Cells*. 2021 [cited 2022 Jul 4]; 10 (10). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34685729/>.
44. Cuzzolin L, Zaccaron A, Fanos V. Unlicensed and off-label uses of drugs in paediatrics: a review of the literature. *Fundam Clin Pharmacol*. 2003 [cited 2022 Jun 30]; 17 (1): 125–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12588640/>.
45. Robertson NJ, Thayyil S, B. Cady E, Raivich G. Magnetic resonance spectroscopy biomarkers in term perinatal asphyxial encephalopathy: from neuropathological correlates to future clinical applications. *Curr Pediatr Rev*. 2014 [cited 2022 Jun 30]; 10 (1): 37–47. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25055862/>.
46. Massaro AN, Chang T, Kadam N, Tsuchida T, Scafidi J, Glass P, et al. Biomarkers of brain injury in neonatal encephalopathy treated with hypothermia. *J Pediatr*. 2012 [cited 2022 Jun 30]; 161 (3): 434–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22494878/>.
47. Jones R, Heep A, Odd D. Biochemical and clinical predictors of hypoxic-ischemic encephalopathy after perinatal asphyxia. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2018 [cited 2022 Jun 30]; 31 (6): 791–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28274150/>.
48. Fatemi A, Wilson MA, Johnston M V. Hypoxic-Ischemic Encephalopathy in the Term Infant [Internet]. *Clinics in Perinatology*. *Clin Perinatol*. 2009 [cited 2022 Jun 30]; 36: 835–58. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19944838/>.
49. Ennen CS, Huisman TAGM, Savage WJ, Northington FJ, Jennings JM, Everett AD, et al. Glial fibrillary acidic protein as a biomarker for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy treated with whole-body cooling. *Am J Obstet Gynecol*. 2011 [cited 2022 Jun 30]; 205 (3): 251.e1–251.e7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21784396/>.
50. Kim HJ, Tsao JW, Stanfill AG. The current state of biomarkers of mild traumatic brain injury. *JCI insight*. 2018 [cited 2022 Jun 30]; 3 (1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29321373/>.
51. Orrock JE, Panchapakesan K, Vezina G, Chang T, Harris K, Wang Y, et al. Association of brain injury and neonatal cytokine response during therapeutic hypothermia in newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatr Res*. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26717001/>.
52. Tann CJ, Martinello KA, Sadoo S, Lawn JE, Seale AC, Vega-Poblete M, et al. Neonatal Encephalopathy With Group B Streptococcal Disease Worldwide: Systematic Review, Investigator Group Datasets, and Meta-analysis. *Clin Infect Dis*. 2017 [cited 2022 Jun 30]; 65 (suppl_2): S173–89. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29117330/>.
53. Murray DM. Biomarkers in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy-Review of the literature to date and future directions for research. *Handb Clin Neurol*. 2019 [cited 2022 Jun 30]; 162: 281–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31324315/>.
54. Alkholy UM, Abdalmonem N, Zaki A, Ali YF, Mohamed SA, Abdelsalam NI, et al. Early predictors of brain damage in full-term newborns with hypoxic ischemic encephalopathy. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2017 [cited 2022 Jun 30]; 13: 2133–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28860770/>.
55. Douglas-Escobar M, Weiss MD. Biomarkers of brain injury in the premature infant. *Front Neurol*. 2013 [cited 2022 Jun 30]; 3 JAN. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23346073/>.
56. Massaro AN, Wu YW, Bammler TK, Comstock B, Mathur A, McKinstry RC, et al. Plasma Biomarkers of Brain Injury in Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *J Pediatr*. 2018 [cited 2022 Jun 30]; 194: 67–75.e1. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29478510/>.
57. Shah DK, Ponnusamy V, Evanson J, Kapellou O, Ekitzidou G, Gupta N, et al. Raised plasma neurofilament light protein levels are associated with abnormal MRI outcomes in newborns undergoing therapeutic hypothermia. *Front Neurol*. 2018 [cited 2022 Jun 30]; 9 (MAR). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29556208/>.
58. Sweetman DU, Onwuneme C, Watson WR, Murphy JFA, Molloy EJ. Perinatal Asphyxia and Erythropoietin and VEGF: Serial Serum and Cerebrospinal Fluid Responses. *Neonatology*. 2017 [cited 2022 Jul 4]; 111 (3): 253–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27902983/>.
59. Lv H, Wang Q, Wu S, Yang L, Ren P, Yang Y, et al. Neonatal hypoxic ischemic encephalopathy-related biomarkers in serum and cerebrospinal fluid. *Clin Chim Acta*. 2015 [cited 2022 Jul 4]; 450: 282–97. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26320853/>.
60. Hasslacher J, Lehner GF, Harler U, Beer R, Ulmer H, Kirchmair R, et al. Secretoneurin as a marker for hypoxic brain injury after cardiopulmonary resuscitation. *Intensive Care Med*. 2014 [cited 2022 Jul 4]; 40 (10): 1518–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25138227/>.
61. Rizzo FM, Sanna A, Gavilanes DAW, Vles HJ, Colivicchi M, Ricotti A, et al. Biomarkers of brain damage in preterm infants. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2012 [cited 2022 Jul 4]; 25 (SUPPL.4): 93–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22958034/>.
62. Chaparro-Huerta V, Flores-Soto ME, Merin Sigala ME, Barrera de León JC, Lemus-Varela M de L, Torres-Mendoza BM de G, et al. Proinflammatory Cytokines, Enolase and S-100 as Early Biochemical Indicators of Hypoxic-Ischemic Encephalopathy Following Perinatal Asphyxia in Newborns. *Pediatr Neonatol*. 2017 [cited 2022 Jul 4]; 58 (1): 70–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27522459/>.
63. Chalak LF, Sánchez PJ, Adams-Huet B, Laptook AR, Heyne RJ, Rosenfeld CR. Biomarkers for severity of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy and outcomes in newborns receiving hypothermia therapy. *J Pediatr*. 2014 [cited 2022 Jul 4]; 164 (3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24332821/>.
64. Chiesa C, Pellegrini G, Panero A, De Luca T, Assumma M, Signore F, et al. Umbilical cord interleukin-6 levels are elevated in term neonates with perinatal asphyxia. *Eur J Clin Invest*. 2003 [cited 2022 Jul 4]; 33 (4): 352–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12662167/>.
65. Jenkins DD, Rollins LG, Perkel JK, Wagner CL, Katikaneni LP, Bass WT, et al. Serum cytokines in a clinical trial of hypothermia for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2012 [cited 2022 Jul 4]; 32 (10): 1888–96. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22805873/>.
66. Hou X, Yuan Z, Wang X, Cheng R, Zhou X, Qiu J. Peptidome analysis of cerebrospinal fluid in neonates with hypoxic-ischemic brain damage. *Mol Brain*. 2020 [cited 2022 Jul 4]; 13 (1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33008433/>.
67. Zhu Y, Yun Y, Jin M, Li G, Li H, Miao P, et al. Identification of novel biomarkers for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy using iTRAQ. *Ital J Pediatr*. 2020 [cited 2022 Jul 4]; 46 (1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32448169/>.
68. Viemann D, Strey A, Janning A, Jurk K, Klimmek K, Vogl T, et al. Myeloid-related proteins 8 and 14 induce a specific inflammatory

- response in human microvascular endothelial cells. *Blood*. 2005 [cited 2022 Jul 4]; 105 (7): 2955–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15598812/>.
69. Ehrchen JM, Sunderkötter C, Foell D, Vogl T, Roth J. The endogenous Toll-like receptor 4 agonist S100A8/S100A9 (calprotectin) as innate amplifier of infection, autoimmunity, and cancer. *J Leukoc Biol*. 2009 [cited 2022 Jul 4]; 86 (3): 557–66. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19451397/>.
 70. Zhao X, Song S, Sun G, Strong R, Zhang J, Grotta JC, et al. Neuroprotective role of haptoglobin after intracerebral hemorrhage. *J Neurosci*. 2009 [cited 2022 Jul 4]; 29 (50): 15819–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20016097/>.
 71. Zhou Y, Bhatia I, Cai Z, He QY, Cheung PT, Chiu JF. Proteomic analysis of neonatal mouse brain: Evidence for hypoxia- and ischemia-induced dephosphorylation of collapsin response mediator proteins. *J Proteome Res*. 2008 [cited 2022 Jul 4]; 7 (6): 2507–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18471005/>.
 72. Solberg R, Kuligowski J, Pankratov L, Escobar J, Quintás G, Lliso I, et al. Changes of the plasma metabolome of newly born piglets subjected to postnatal hypoxia and resuscitation with air. *Pediatr Res*. 2016 [cited 2022 Jul 4]; 80 (2): 284–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27055187/>.
 73. Li H, Kittur FS, Hung CY, Li PA, Ge X, Sane DC, et al. Quantitative Proteomics Reveals the Beneficial Effects of Low Glucose on Neuronal Cell Survival in an in vitro Ischemic Penumbral Model. *Front Cell Neurosci*. 2020 [cited 2022 Jul 4]; 14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33033473/>.
 74. Shi Y, Cai EL, Yang C, Ye CY, Zeng P, Wang XM, et al. Protection of melatonin against acidosis-induced neuronal injuries. *J Cell Mol Med*. 2020 [cited 2022 Jul 4]; 24 (12): 6928–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32364678/>.
 75. Bjerkhaug AU, Granslo HN, Klingenberg C. Metabolic responses in neonatal sepsis-A systematic review of human metabolomic studies. *Acta Paediatr*. 2021 [cited 2022 Jun 29]; 110 (8): 2316–25. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33851423/>.
 76. Beckstrom AC, Ricca RL, Gow KW, McAdams RM. Persistent posterior pneumomediastinum in a neonate. *Pediatr Int*. 2012 [cited 2022 Jul 4]; 54 (3): 441–2. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22631580/>.
 77. Nicholson JK, Lindon JC. Systems biology: Metabonomics. *Nature*. 2008 [cited 2022 Jul 4]; 455 (7216): 1054–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18948945/>.
 78. Atzori L, Antonucci R, Barberini L, Griffin JL, Fanos V. Metabonomics: a new tool for the neonatologist. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2009 [cited 2022 Jul 4]; 22 (SUPPL. 3): 50–3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19701858/>.
 79. Locci E, Noto A, Puddu M, Pomeroy G, Demontis R, Dalmazzo C, et al. A longitudinal 1H-NMR metabolomics analysis of urine from newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy undergoing hypothermia therapy. Clinical and medical legal insights. *PLoS One*. 2018 [cited 2022 Jul 4]; 13 (4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29668681/>.
 80. Sarafidis K, Efstathiou N, Begou O, Soubasi V, Agakidou E, Gika E, et al. Urine metabolomic profile in neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Hippokratia*. 2017 [cited 2022 Jul 4]; 21 (2): 80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29668681/>.
 81. Denihan NM, Kirwan JA, Walsh BH, Dunn WB, Broadhurst DI, Boylan GB, et al. Untargeted metabolomic analysis and pathway discovery in perinatal asphyxia and hypoxic-ischaemic encephalopathy. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2019 [cited 2022 Jul 4]; 39 (1): 147–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31668168/>.
 82. Jia Y, Jia X, Xu H, Gao L, Wei C, Li Y, et al. Blood Plasma Metabolic Profile of Newborns with Hypoxic-Ischaemic Encephalopathy by GC-MS. *Biomed Res Int*. 2021 [cited 2022 Jul 4]; 2021. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34258280/>.
 83. Reinke SN, Walsh BH, Boylan GB, Sykes BD, Kenny LC, Murray DM, et al. 1H NMR derived metabolomic profile of neonatal asphyxia in umbilical cord serum: implications for hypoxic ischemic encephalopathy. *J Proteome Res*. 2013 [cited 2022 Jul 4]; 12 (9): 4230–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23931672/>.
 84. Longini M, Giglio S, Perrone S, Vivi A, Tassini M, Fanos V, et al. Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy of urine samples in preterm asphyctic newborn: a metabolomic approach. *Clin Chim Acta*. 2015 [cited 2022 Jul 4]; 444: 250–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25727514/>.
 85. Johnston M V. Excitotoxicity in perinatal brain injury. *Brain Pathol*. 2005 [cited 2022 Jul 4]; 15 (3): 234–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16196390/>.
 86. Pietz J, Guttenberg N, Gluck L. Hypoxanthine: a marker for asphyxia. *Obstet Gynecol*. 1988 [cited 2022 Jul 4]; 72 (5): 762–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3140152/>.
 87. Penry JT, Manore MM. Choline: An important micronutrient for maximal endurance-exercise performance? *Int J Sport Nutr Exerc Metab*. 2008 [cited 2022 Jul 4]; 18: 191–203. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18458362/>.
 88. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol*. 2013 [cited 2022 Jul 4]; 200 (4): 373–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23420871/>.
 89. Chivet M, Hemming F, Pernet-Gallay K, Fraboulet S, Sadoul R. Emerging role of neuronal exosomes in the central nervous system. *Front Physiol*. 2012 [cited 2022 Jul 4]; 3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22654762/>.
 90. Chiva-Blanch G, Suades R, Crespo J, Peña E, Padró T, Jiménez-Xarrié E, et al. Microparticle Shedding from Neural Progenitor Cells and Vascular Compartment Cells Is Increased in Ischemic Stroke. *PLoS One*. 2016 [cited 2022 Jul 4]; 11 (1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26815842/>.
 91. Patz S, Trattig C, Grünbacher G, Ebner B, Güllü C, Novak A, et al. More than cell dust: microparticles isolated from cerebrospinal fluid of brain injured patients are messengers carrying mRNAs, miRNAs, and proteins. *J Neurotrauma*. 2013 [cited 2022 Jul 4]; 30 (14): 1232–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23360174/>.
 92. Goetzl EJ, Boxer A, Schwartz JB, Abner EL, Petersen RC, Miller BL, et al. Low neural exosomal levels of cellular survival factors in Alzheimer's disease. *Ann Clin Transl Neurol*. 2015 [cited 2022 Jul 4]; 2 (7): 769–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26273689/>.
 93. Goetzl EJ, Boxer A, Schwartz JB, Abner EL, Petersen RC, Miller BL, et al. Altered lysosomal proteins in neural-derived plasma exosomes in preclinical Alzheimer disease. *Neurology*. 2015 [cited 2022 Jul 4]; 85 (1): 40–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26062630/>.
 94. Силачев Д. Н., Горюнов К. В., Плотников Е. Ю., Шевцова Ю. А., Бабенко В. А., Буров А. А., et al. Внеклеточные везикулы мочи как диагностический маркер почечных патологий. «Педиатрия» имени Г. Н. Сперанского. 2020 [cited 2022 Jul 4]; 99 (5): 154–63. Available from: <https://pediatrjournal.ru/archive?show=378§ion=6017>.
 95. Goetzl L, Merabova N, Darbinian N, Martirosyan D, Poletto E, Fugarolas K, et al. Diagnostic Potential of Neural Exosome Cargo as Biomarkers for Acute Brain Injury. *Ann Clin Transl Neurol*. 2018 [cited 2022 Jul 4]; 5 (1): 4–10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29376087/>.
 96. Pineles B, Mani A, Sura L, Rossignol C, Albayram M, Weiss MD, et al. Neuronal exosome proteins: novel biomarkers for predicting neonatal response to therapeutic hypothermia. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2022 [cited 2022 Jul 4]; 107 (1): F60–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34021027/>.
 97. Chen S, Chen XC, Lou XH, Qian SQ, Ruan ZW. Determination of serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a prognostic biomarker of acute spontaneous intracerebral hemorrhage. *Clin Chim Acta*. 2019 [cited 2022 Jul 4]; 492: 72–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30771300/>.
 98. Плотников Е. Ю., Силачев Д. Н., Павленко Т. А., Павлова В. С., Крючко Д. С., Зубков ВВ, et al. Острое повреждение почек у новорожденных. От эксперимента к клинике. *Неонатология*. 2017; (4): 58–63.
 99. Xu D, Hopf C, Reddy R, Cho RW, Guo L, Lanahan A, et al. Narp and NP1 form heterocomplexes that function in developmental and activity-dependent synaptic plasticity. *Neuron*. 2003 [cited 2022 Jul 4]; 39 (3): 513–28. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12895424/>.

References

1. Manuck TA, Rice MM, Bailit JL, Grobman WA, Reddy UM, Wapner RJ, et al. Preterm neonatal morbidity and mortality by gestational age: a contemporary cohort. *Am J Obstet Gynecol*. 2016 [cited 2022 Jun 28]; 215 (1): 103.e1–103.e14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26772790/>.
2. Thornberg E, Thiringer K, Odeback A, Milsom I. Birth asphyxia: incidence, clinical course and outcome in a Swedish population. *Acta Paediatrica*. 1995 [cited 2022 Jun 28]; 84 (8): 927–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7488819/>.
3. Thorngren-Jerneck K, Herbst A. Low 5-minute Apgar score: a population-based register study of 1 million term births. *Obstet Gynecol*. 2001 [cited 2022 Jun 28]; 98 (1): 65–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11430958/>.
4. Volpe JJ. Neonatal encephalopathy: an inadequate term for hypoxic-ischemic encephalopathy. *Ann Neurol*. 2012 [cited 2022 Jun 28]; 72 (2): 156–66. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22926849/>.
5. Lawn J, Shibuya K, Stein C. No cry at birth: global estimates of intrapartum stillbirths and intrapartum-related neonatal deaths. *Bull World Health Organ*. 2005 [cited 2022 Jun 28]; 83 (6): 409. Available from: <https://pmc/articles/PMC2626256/?report=abstract>.
6. Hoehn T, Hansmann G, Bühner C, Simbruner G, Gunn AJ, Yager J, et al. Therapeutic hypothermia in neonates. Review of current clinical data, ILCOR recommendations and suggestions for implementation in neonatal intensive care units. *Resuscitation*. 2008 [cited 2022 Jun 28]; 78 (1): 7–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18554560/>.
7. Okerefor A, Allsop J, Counsell SJ, Fitzpatrick J, Azzopardi D, Rutherford MA, et al. Patterns of brain injury in neonates exposed to perinatal sentinel events. *Pediatrics*. 2008 [cited 2022 Jun 28]; 121 (5): 906–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18450893/>.
8. Long M, Brandon DH. Induced hypothermia for neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Obstet Gynecol neonatal Nurs JOGNN*. 2007 [cited 2022 Jun 28]; 36 (3): 293–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17489937/>.
9. Pierrat V, Haouari N, Liska A, Thomas D, Subtil D, Truffert P. Prevalence, causes, and outcome at 2 years of age of newborn encephalopathy: population based study. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2005 [cited 2022 Jun 28]; 90(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15846019/>.
10. Lee ACC, Kozuki N, Blencowe H, Vos T, Bahalim A, Darmstadt GL, et al. Intrapartum-related neonatal encephalopathy incidence and impairment at regional and global levels for 2010 with trends from 1990. *Pediatr Res*. 2013 [cited 2022 Jun 28]; 74 Suppl 1(Suppl 1): 50–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24366463/>.
11. Wang LS, Cheng GQ, Zhou WH, Sun JQ, Cao Y, Shao XM. Meta-analysis of mild hypothermia for gestational age over 35-week newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Natl Med J China*. 2012 [cited 2022 Jun 28]; 92 (20): 1400–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22883198/>.
12. Edwards AD, Brocklehurst P, Gunn AJ, Halliday H, Juszczak E, Levene M, et al. Neurological outcomes at 18 months of age after moderate hypothermia for perinatal hypoxic ischaemic encephalopathy: synthesis and meta-analysis of trial data. *BMJ*. 2010 [cited 2022 Jun 28]; 340 (7743): 409. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20144981/>.
13. Oliveira V, Singhvi DP, Montaldo P, Lally PJ, Mendoza J, Manerkar S, et al. Therapeutic hypothermia in mild neonatal encephalopathy: a national survey of practice in the UK. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2018 [cited 2022 Jun 28]; 103 (4): F1–3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28942433/>.
14. Prempunpong C, Chalak LF, Garfinkle J, Shah B, Kalra V, Rollins N, et al. Prospective research on infants with mild encephalopathy: The PRIME study. *Journal of Perinatology. J Perinatol*. 2018 [cited 2022 Jun 28]; 38: 80–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29095433/>.
15. Chalak LF, Nguyen KA, Prempunpong C, Heyne R, Thayil S, Shankaran S, et al. Prospective research in infants with mild encephalopathy identified in the first six hours of life: neurodevelopmental outcomes at 18–22 months. *Pediatr Res*. 2018 [cited 2022 Jun 28]; 84 (6): 861–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30250303/>.
16. Murray DM, O'Connor CM, Anthony Ryan C, Korotchikova I, Boylan GB. Early EEG Grade and Outcome at 5 Years After Mild Neonatal Hypoxic Ischemic Encephalopathy. *Pediatrics*. 2016 [cited 2022 Jun 28]; 138 (4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27650049/>.
17. Conway JM, Walsh BH, Boylan GB, Murray DM. Mild hypoxic ischaemic encephalopathy and long term neurodevelopmental outcome — A systematic review. *Early Hum Dev*. 2018 [cited 2022 Jun 28]; 120: 80–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29496329/>.
18. Nanavati T, Seemaladinne N, Regier M, Yossuck P, Pergami P. Can We Predict Functional Outcome in Neonates with Hypoxic Ischemic Encephalopathy by the Combination of Neuroimaging and Electroencephalography? *Pediatr Neonatol*. 2015 [cited 2022 Jun 28]; 56 (5): 307–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25862075/>.
19. Polat M, Şimşek A, Tansuğ N, Sezer RG, Özkol M, Başpınar P, et al. Prediction of neurodevelopmental outcome in term neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Eur J Paediatr Neurol*. 2013 [cited 2022 Jun 28]; 17 (3): 288–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23231917/>.
20. Shellhaas RA, Kushwaha JS, Plegue MA, Selewski DT, Barks JDE. An Evaluation of Cerebral and Systemic Predictors of 18-Month Outcomes for Neonates With Hypoxic Ischemic Encephalopathy. *J Child Neurol*. 2015 [cited 2022 Jun 28]; 30 (11): 1526–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25724376/>.
21. Chang T, Du Plessis A. Neurodiagnostic techniques in neonatal critical care. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2012 [cited 2022 Jun 29]; 12 (2): 145–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22318538/>.
22. Van Laerhoven H, De Haan TR, Offringa M, Post B, Van Der Lee JH. Prognostic tests in term neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy: a systematic review. *Pediatrics*. 2013 [cited 2022 Jun 29]; 131 (1): 88–98. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23248219/>.
23. Rasmussen LA, Cascio MA, Ferrand A, Shevell M, Racine E. The complexity of physicians' understanding and management of prognostic uncertainty in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Perinatol*. 2019 [cited 2022 Jun 29]; 39 (2): 278–85. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30568164/>.
24. Natarajan N, Pardo AC. Challenges in neurologic prognostication after neonatal brain injury. *Semin Perinatol*. 2017 [cited 2022 Jun 29]; 41 (2): 117–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28139254/>.
25. Merchant N, Azzopardi D. Early predictors of outcome in infants treated with hypothermia for hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Dev Med Child Neurol*. 2015 [cited 2022 Jun 29]; 57 (S3): 8–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25800487/>.
26. Merhar SL, Chau V. Neuroimaging and Other Neurodiagnostic Tests in Neonatal Encephalopathy. *Clin Perinatol*. 2016 [cited 2022 Jun 29]; 43 (3): 511–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27524451/>.
27. Del Río R, Ochoa C, Alarcon A, Arnáez J, Blanco D, García-Alix A. Amplitude integrated electroencephalogram as a prognostic tool in neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy: A systematic review. *PLoS One*. 2016 [cited 2022 Jun 29]; 11 (11). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27802300/>.
28. Mizrahi EM. Neonatal seizures and neonatal epileptic syndromes. *Neurol Clin*. 2001 [cited 2022 Jun 29]; 19 (2): 427–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11358751/>.
29. Murray DM, Boylan GB, Ali I, Ryan CA, Murphy BP, Connolly S. Defining the gap between electrographic seizure burden, clinical expression and staff recognition of neonatal seizures. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2008 [cited 2022 Jun 29]; 93 (3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17626147/>.
30. Clancy RR, Legido A, Lewis D. Occult neonatal seizures. *Epilepsia*. 1988 [cited 2022 Jun 29]; 29 (3): 256–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30250303/>.

- pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3371282/.
31. Weeke LC, Boylan GB, Pressler RM, Hallberg B, Blennow M, Toet MC, et al. Role of EEG background activity, seizure burden and MRI in predicting neurodevelopmental outcome in full-term infants with hypoxic-ischaemic encephalopathy in the era of therapeutic hypothermia. *Eur J Paediatr Neurol*. 2016 [cited 2022 Jun 28]; 20 (6): 855–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27370316/>.
 32. Gunn AJ, Wyatt JS, Whitelaw A, Barks J, Azzopardi D, Ballard R, et al. Therapeutic hypothermia changes the prognostic value of clinical evaluation of neonatal encephalopathy. *J Pediatr*. 2008 [cited 2022 Jun 29]; 152 (1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18154900/>.
 33. Boudes E, Tan X, Saint-Martin C, Shevell M, Wintermark P. MRI obtained during versus after hypothermia in asphyxiated newborns. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2015 [cited 2022 Jun 29]; 100 (3): F238–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25605620/>.
 34. Bonifacio SL, deVries LS, Groenendaal F. Impact of hypothermia on predictors of poor outcome: how do we decide to redirect care? *Semin Fetal Neonatal Med*. 2015 [cited 2022 Jun 29]; 20 (2): 122–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25577654/>.
 35. Thoresen M, Tooley J, Liu X, Jary S, Fleming P, Luyt K, et al. Time is brain: starting therapeutic hypothermia within three hours after birth improves motor outcome in asphyxiated newborns. *Neonatology*. 2013 [cited 2022 Jun 29]; 104 (3): 228–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24030160/>.
 36. Basu SK, Kaiser JR, Guffey D, Minard CG, Guillet R, Gunn AJ. Hypoglycaemia and hyperglycaemia are associated with unfavourable outcome in infants with hypoxic ischaemic encephalopathy: A post hoc analysis of the CoolCap Study. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2016 [cited 2022 Jun 29]; 101 (2): F149–55. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26283669/>.
 37. Shah DK, Wusthoff CJ, Clarke P, Wyatt JS, Ramaiah SM, Dias RJ, et al. Electrographic seizures are associated with brain injury in newborns undergoing therapeutic hypothermia. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2014 [cited 2022 Jun 29]; 99 (3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24443407/>.
 38. Sabir H, Jary S, Tooley J, Liu X, Thoresen M. Increased inspired oxygen in the first hours of life is associated with adverse outcome in newborns treated for perinatal asphyxia with therapeutic hypothermia. *J Pediatr*. 2012 [cited 2022 Jun 29]; 161 (3): 409–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22521111/>.
 39. Osredkar D, Thoresen M, Maes E, Flatebø T, Elstad M, Sabir H. Hypothermia is not neuroprotective after infection-sensitized neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Resuscitation*. 2014 [cited 2022 Jun 29]; 85 (4): 567–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24361672/>.
 40. Uziel G, Ghezzi D, Zeviani M. Infantile mitochondrial encephalopathy. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2011 [cited 2022 Jun 29]; 16: 205–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21620787/>.
 41. Bruylant M, Liebaers I, Sacre L, Vandeplas Y, De Meirleir L, Martin JJ. Neonatal myotubular myopathy with a probable X-linked inheritance: observations on a new family with a review of the literature. *J Neurol*. 1984 [cited 2022 Jun 29]; 231 (4): 220–2. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6512577/>.
 42. Danti FR, Galosi S, Romani M, Montomoli M, Carss KJ, Lucy Raymond F, et al. GNAO1 encephalopathy: Broadening the phenotype and evaluating treatment and outcome. *Neurol Genet*. 2017 [cited 2022 Jul 4]; 3 (2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28357411/>.
 43. Solis GP, Kozhanova TV, Koval A, Zhilina SS, Mescheryakova TI, Abramov AA, et al. Pediatric Encephalopathy: Clinical, Biochemical and Cellular Insights into the Role of Gln52 of GNAO1 and GNAI1 for the Dominant Disease. *Cells*. 2021 [cited 2022 Jul 4]; 10 (10). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34685729/>.
 44. Cuzzolin L, Zaccaron A, Fanos V. Unlicensed and off-label uses of drugs in paediatrics: a review of the literature. *Fundam Clin Pharmacol*. 2003 [cited 2022 Jun 30]; 17 (1): 125–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12588640/>.
 45. Robertson NJ, Thayyil S, B. Cady E, Raivich G. Magnetic resonance spectroscopy biomarkers in term perinatal asphyxial encephalopathy: from neuropathological correlates to future clinical applications. *Curr Pediatr Rev*. 2014 [cited 2022 Jun 30]; 10 (1): 37–47. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25055862/>.
 46. Massaro AN, Chang T, Kadom N, Tsuchida T, Scafidi J, Glass P, et al. Biomarkers of brain injury in neonatal encephalopathy treated with hypothermia. *J Pediatr*. 2012 [cited 2022 Jun 30]; 161 (3): 434–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22494878/>.
 47. Jones R, Heep A, Odd D. Biochemical and clinical predictors of hypoxic-ischemic encephalopathy after perinatal asphyxia. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2018 [cited 2022 Jun 30]; 31 (6): 791–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28274150/>.
 48. Fatemi A, Wilson MA, Johnston M V. Hypoxic-Ischemic Encephalopathy in the Term Infant [Internet]. *Clinics in Perinatology*. *Clin Perinatol*. 2009 [cited 2022 Jun 30]; 36: 835–58. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19944838/>.
 49. Ennen CS, Huisman TAGM, Savage WJ, Northington FJ, Jennings JM, Everett AD, et al. Glial fibrillary acidic protein as a biomarker for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy treated with whole-body cooling. *Am J Obstet Gynecol*. 2011 [cited 2022 Jun 30]; 205 (3): 251.e1–251.e7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21784396/>.
 50. Kim HJ, Tsao JW, Stanfill AG. The current state of biomarkers of mild traumatic brain injury. *JCI insight*. 2018 [cited 2022 Jun 30]; 3 (1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29321373/>.
 51. Orrock JE, Panchapakesan K, Vezina G, Chang T, Harris K, Wang Y, et al. Association of brain injury and neonatal cytokine response during therapeutic hypothermia in newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatr Res*. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26717001/>.
 52. Tann CJ, Martinello KA, Sadoo S, Lawn JE, Seale AC, Vega-Poblete M, et al. Neonatal Encephalopathy With Group B Streptococcal Disease Worldwide: Systematic Review, Investigator Group Datasets, and Meta-analysis. *Clin Infect Dis*. 2017 [cited 2022 Jun 30]; 65 (suppl_2): S173–89. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29117330/>.
 53. Murray DM. Biomarkers in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy-Review of the literature to date and future directions for research. *Handb Clin Neurol*. 2019 [cited 2022 Jun 30]; 162: 281–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31324315/>.
 54. Alkholy UM, Abdalmonem N, Zaki A, Ali YF, Mohamed SA, Abdelsalam NI, et al. Early predictors of brain damage in full-term newborns with hypoxic ischemic encephalopathy. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2017 [cited 2022 Jun 30]; 13: 2133–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28860770/>.
 55. Douglas-Escobar M, Weiss MD. Biomarkers of brain injury in the premature infant. *Front Neurol*. 2013 [cited 2022 Jun 30]; 3 JAN. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23346073/>.
 56. Massaro AN, Wu YW, Bammler TK, Comstock B, Mathur A, McKinstry RC, et al. Plasma Biomarkers of Brain Injury in Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *J Pediatr*. 2018 [cited 2022 Jun 30]; 194: 67–75.e1. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29478510/>.
 57. Shah DK, Ponnusamy V, Evanson J, Kapellou O, Ekitizidou G, Gupta N, et al. Raised plasma neurofilament light protein levels are associated with abnormal MRI outcomes in newborns undergoing therapeutic hypothermia. *Front Neurol*. 2018 [cited 2022 Jun 30]; 9 (MAR). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29556208/>.
 58. Sweetman DU, Onwuneme C, Watson WR, Murphy JFA, Molloy EJ. Perinatal Asphyxia and Erythropoietin and VEGF: Serial Serum and Cerebrospinal Fluid Responses. *Neonatology*. 2017 [cited 2022 Jul 4]; 111 (3): 253–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27902983/>.
 59. Lv H, Wang Q, Wu S, Yang L, Ren P, Yang Y, et al. Neonatal hypoxic ischemic encephalopathy-related biomarkers in serum and cerebrospinal fluid. *Clin Chim Acta*. 2015 [cited 2022 Jul 4]; 450: 282–97. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26320853/>.
 60. Hasslacher J, Lehner GF, Harler U, Beer R, Ulmer H, Kirchmair R,

- et al. Secretoneurin as a marker for hypoxic brain injury after cardiopulmonary resuscitation. *Intensive Care Med.* 2014 [cited 2022 Jul 4]; 40 (10): 1518–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25138227/>.
61. Risso FM, Sannia A, Gavilanes DAW, Vles HJ, Colivicchi M, Ricotti A, et al. Biomarkers of brain damage in preterm infants. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2012 [cited 2022 Jul 4]; 25 (SUPPL.4): 93–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22958034/>.
 62. Chaparro-Huerta V, Flores-Soto ME, Merin Sigala ME, Barrera de León JC, Lemus-Varela M de L, Torres-Mendoza BM de G, et al. Proinflammatory Cytokines, Enolase and S-100 as Early Biochemical Indicators of Hypoxic-Ischemic Encephalopathy Following Perinatal Asphyxia in Newborns. *Pediatr Neonatol.* 2017 [cited 2022 Jul 4]; 58 (1): 70–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27522459/>.
 63. Chalak LF, Sánchez PJ, Adams-Huet B, Laptook AR, Heyne RJ, Rosenfeld CR. Biomarkers for severity of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy and outcomes in newborns receiving hypothermia therapy. *J Pediatr.* 2014 [cited 2022 Jul 4]; 164 (3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24332821/>.
 64. Chiesa C, Pellegrini G, Panero A, De Luca T, Assumma M, Signore F, et al. Umbilical cord interleukin-6 levels are elevated in term neonates with perinatal asphyxia. *Eur J Clin Invest.* 2003 [cited 2022 Jul 4]; 33 (4): 352–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12662167/>.
 65. Jenkins DD, Rollins LG, Perkel JK, Wagner CL, Katikaneni LP, Bass WT, et al. Serum cytokines in a clinical trial of hypothermia for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2012 [cited 2022 Jul 4]; 32 (10): 1888–96. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22805873/>.
 66. Hou X, Yuan Z, Wang X, Cheng R, Zhou X, Qiu J. Peptidome analysis of cerebrospinal fluid in neonates with hypoxic-ischemic brain damage. *Mol Brain.* 2020 [cited 2022 Jul 4]; 13 (1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33008433/>.
 67. Zhu Y, Yun Y, Jin M, Li G, Li H, Miao P, et al. Identification of novel biomarkers for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy using iTRAQ. *Ital J Pediatr.* 2020 [cited 2022 Jul 4]; 46 (1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32448169/>.
 68. Viemann D, Strey A, Janning A, Jurk K, Klimmek K, Vogl T, et al. Myeloid-related proteins 8 and 14 induce a specific inflammatory response in human microvascular endothelial cells. *Blood.* 2005 [cited 2022 Jul 4]; 105 (7): 2955–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15598812/>.
 69. Ehrchen JM, Sunderkötter C, Foell D, Vogl T, Roth J. The endogenous Toll-like receptor 4 agonist S100A8/S100A9 (calprotectin) as innate amplifier of infection, autoimmunity, and cancer. *J Leukoc Biol.* 2009 [cited 2022 Jul 4]; 86 (3): 557–66. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19451397/>.
 70. Zhao X, Song S, Sun G, Strong R, Zhang J, Grotta JC, et al. Neuroprotective role of haptoglobin after intracerebral hemorrhage. *J Neurosci.* 2009 [cited 2022 Jul 4]; 29 (50): 15819–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20016097/>.
 71. Zhou Y, Bhatia I, Cai Z, He QY, Cheung PT, Chiu JF. Proteomic analysis of neonatal mouse brain: Evidence for hypoxia- and ischemia-induced dephosphorylation of collapsin response mediator proteins. *J Proteome Res.* 2008 [cited 2022 Jul 4]; 7 (6): 2507–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18471005/>.
 72. Solberg R, Kuligowski J, Pankratov L, Escobar J, Quintás G, Liso I, et al. Changes of the plasma metabolome of newly born piglets subjected to postnatal hypoxia and resuscitation with air. *Pediatr Res.* 2016 [cited 2022 Jul 4]; 80 (2): 284–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27055187/>.
 73. Li H, Kittur FS, Hung CY, Li PA, Ge X, Sane DC, et al. Quantitative Proteomics Reveals the Beneficial Effects of Low Glucose on Neuronal Cell Survival in an in vitro Ischemic Penumbral Model. *Front Cell Neurosci.* 2020 [cited 2022 Jul 4]; 14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33033473/>.
 74. Shi Y, Cai EL, Yang C, Ye CY, Zeng P, Wang XM, et al. Protection of melatonin against acidosis-induced neuronal injuries. *J Cell Mol Med.* 2020 [cited 2022 Jul 4]; 24 (12): 6928–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32364678/>.
 75. Bjerkhaug AU, Granslo HN, Klingenberg C. Metabolic responses in neonatal sepsis-A systematic review of human metabolomic studies. *Acta Paediatr.* 2021 [cited 2022 Jun 29]; 110 (8): 2316–25. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33851423/>.
 76. Beckstrom AC, Ricca RL, Gow KW, McAdams RM. Persistent posterior pneumomediastinum in a neonate. *Pediatr Int.* 2012 [cited 2022 Jul 4]; 54 (3): 441–2. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22631580/>.
 77. Nicholson JK, Lindon JC. Systems biology: Metabonomics. *Nature.* 2008 [cited 2022 Jul 4]; 455 (7216): 1054–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18948945/>.
 78. Atzori L, Antonucci R, Barberini L, Griffin JL, Fanos V. Metabonomics: a new tool for the neonatologist. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2009 [cited 2022 Jul 4]; 22 (SUPPL. 3): 50–3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19701858/>.
 79. Locci E, Noto A, Puddu M, Pomerio G, Demontis R, Dalmazzo C, et al. A longitudinal 1H-NMR metabolomics analysis of urine from newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy undergoing hypothermia therapy. Clinical and medical legal insights. *PLoS One.* 2018 [cited 2022 Jul 4]; 13 (4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29668681/>.
 80. Sarafidis K, Efstathiou N, Begou O, Soubasi V, Agakidou E, Gika E, et al. Urine metabolomic profile in neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Hippokratia.* 2017 [cited 2022 Jul 4]; 21 (2): 80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29668681/>.
 81. Denihan NM, Kirwan JA, Walsh BH, Dunn WB, Broadhurst DI, Boylan GB, et al. Untargeted metabolomic analysis and pathway discovery in perinatal asphyxia and hypoxic-ischaemic encephalopathy. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2019 [cited 2022 Jul 4]; 39 (1): 147–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3116668/>.
 82. Jia Y, Jia X, Xu H, Gao L, Wei C, Li Y, et al. Blood Plasma Metabolic Profile of Newborns with Hypoxic-Ischaemic Encephalopathy by GC-MS. *Biomed Res Int.* 2021 [cited 2022 Jul 4]; 2021. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34258280/>.
 83. Reinke SN, Walsh BH, Boylan GB, Sykes BD, Kenny LC, Murray DM, et al. 1H NMR derived metabolomic profile of neonatal asphyxia in umbilical cord serum: implications for hypoxic ischemic encephalopathy. *J Proteome Res.* 2013 [cited 2022 Jul 4]; 12 (9): 4230–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23931672/>.
 84. Longini M, Giglio S, Perrone S, Vivi A, Tassini M, Fanos V, et al. Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy of urine samples in preterm asphyctic newborn: a metabolomic approach. *Clin Chim Acta.* 2015 [cited 2022 Jul 4]; 444: 250–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25727514/>.
 85. Johnston M V. Excitotoxicity in perinatal brain injury. *Brain Pathol.* 2005 [cited 2022 Jul 4]; 15 (3): 234–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16196390/>.
 86. Pietz J, Guttenberg N, Gluck L. Hypoxanthine: a marker for asphyxia. *Obstet Gynecol.* 1988 [cited 2022 Jul 4]; 72 (5): 762–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3140152/>.
 87. Penry JT, Manore MM. Choline: An important micronutrient for maximal endurance-exercise performance? *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* 2008 [cited 2022 Jul 4]; 18: 191–203. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18458362/>.
 88. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol.* 2013 [cited 2022 Jul 4]; 200 (4): 373–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23420871/>.
 89. Chivet M, Hemming F, Pernet-Gallay K, Fraboulet S, Sadoul R. Emerging role of neuronal exosomes in the central nervous system. *Front Physiol.* 2012 [cited 2022 Jul 4]; 3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22654762/>.
 90. Chiva-Blanch G, Suades R, Crespo J, Peña E, Padró T, Jiménez-Xarrié E, et al. Microparticle Shedding from Neural Progenitor Cells and Vascular Compartment Cells Is Increased in Ischemic Stroke. *PLoS One.* 2016 [cited 2022 Jul 4]; 11 (1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26815842/>.
 91. Patz S, Trattig C, Grünbacher G, Ebner B, Güllü C, Novak A, et al. More than cell dust: microparticles isolated from cerebrospinal fluid of brain injured patients are messengers carrying mRNAs, miRNAs, and proteins. *J Neurotrauma.* 2013 [cited 2022 Jul 4]; 30 (14): 1232–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23360174/>.

92. Goetzl EJ, Boxer A, Schwartz JB, Abner EL, Petersen RC, Miller BL, et al. Low neural exosomal levels of cellular survival factors in Alzheimer's disease. *Ann Clin Transl Neurol.* 2015 [cited 2022 Jul 4]; 2 (7): 769–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26273689/>.
93. Goetzl EJ, Boxer A, Schwartz JB, Abner EL, Petersen RC, Miller BL, et al. Altered lysosomal proteins in neural-derived plasma exosomes in preclinical Alzheimer disease. *Neurology.* 2015 [cited 2022 Jul 4]; 85 (1): 40–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26062630/>.
94. Silachev DN, Goryunov KV, Plotnikov EY, Shevtsova YA, Babenko VA, Burov AA, et al. Urinary extracellular vesicles as markers for kidney diseases. *Pediatrics n.a. G.N. Speransky.* 2020 [cited 2022 Jul 4]; 99 (5): 154–63. Available from: <https://pediatrajournal.ru/archive?show=378§ion=6017>. Russian.
95. Goetzl L, Merabova N, Darbinian N, Martirosyan D, Poletto E, Fugarolas K, et al. Diagnostic Potential of Neural Exosome Cargo as Biomarkers for Acute Brain Injury. *Ann Clin Transl Neurol.* 2018 [cited 2022 Jul 4]; 5 (1): 4–10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29376087/>.
96. Pineles B, Mani A, Sura L, Rossignol C, Albayram M, Weiss MD, et al. Neuronal exosome proteins: novel biomarkers for predicting neonatal response to therapeutic hypothermia. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2022 [cited 2022 Jul 4]; 107 (1): F60–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34021027/>.
97. Chen S, Chen XC, Lou XH, Qian SQ, Ruan ZW. Determination of serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a prognostic biomarker of acute spontaneous intracerebral hemorrhage. *Clin Chim Acta.* 2019 [cited 2022 Jul 4]; 492: 72–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30771300/>.
98. Plotnikov EY, Silachev DN, Pavlenko TA, Pavlova VS, Kryukov DS, Zubkov VV, et al. Acute kidney injury in newborns. From experiment to clinic. *Neonatologiya.* 2017; (4): 58–63. Russian.
99. Xu D, Hopf C, Reddy R, Cho RW, Guo L, Lanahan A, et al. Narp and NP1 form heterocomplexes that function in developmental and activity-dependent synaptic plasticity. *Neuron.* 2003 [cited 2022 Jul 4]; 39 (3): 513–28. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12895424/>.

СОДЕРЖАНИЕ CD4⁺-КЛЕТОК С ЭКСПРЕССИЕЙ ЭКТОНУКЛЕОТИДАЗ CD39/CD73 У ДЕТЕЙ С ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ КИШЕЧНИКАТ. В. Радыгина¹✉, С. В. Петричук¹, Д. Г. Купцова¹, А. С. Потапов^{1,2}, А. С. Илларионов², А. О. Анушенко¹, О. В. Курбатова¹, Е. Л. Семикина^{1,2}¹ Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей, Москва, Россия² Первый московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Изучение регуляции иммунного ответа на фоне терапии блокаторами TNF при воспалительных заболеваниях кишечника (ВЗК) у детей остается актуальной проблемой. Целью исследования было изучить экспрессию CD39/CD73 в субпопуляциях лимфоцитов (регуляторных Т-клеток (Treg) — CD4⁺CD127^{low}CD25^{high}; активированных Т-клеток (Tact) — CD4⁺CD25⁺CD127^{high}; Th17-лимфоцитов — CD4⁺CD161⁺CD3⁺) периферической крови у детей с ВЗК (с болезнью Крона (БК), $n = 34$; с язвенным колитом — $n = 33$), принимавших блокаторы TNF, и у 45 условно здоровых детей. Результаты представлены в виде медианы (Me) и квартилей (Q_{25} – Q_{75}). С помощью многоцветной цитометрии показано, что у детей с ВЗК наибольшее количество CD39⁺ выявлено в популяции Treg — 31% (15–38), наименьшее — в Tact 4% (1–7), а наибольшее количество CD73⁺ — в Tact 13% (8–21). Соотношение экспрессии CD39 и CD73 у пациентов с ВЗК, так же как и в группе сравнения, зависело от популяции клеток. Экспрессия CD39 в Treg, Tact и Th17 у пациентов с ВЗК не зависела от возраста ребенка. В группе детей с БК в обострении относительно группы сравнения получено снижение экспрессии CD39 в Treg (12% (9–23) против 35% (28–39), $p = 0,000001$). У детей в ремиссии БК экспрессия CD39 в Treg достоверно выше, чем при обострении (31% (27–40) против 12% (9–23); $p = 0,000094$). Между группой пациентов в ремиссии и группой сравнения достоверных различий выявлено не было, за исключением снижения экспрессии CD73 в Treg при БК. Полученные результаты показывают, что экспрессия CD39 и CD73 в популяциях CD4⁺-лимфоцитов в значительной степени связана с течением заболевания, с обострением или ремиссией, и, соответственно, с эффективностью проводимой анти-TNF-терапии.

Ключевые слова: популяции лимфоцитов, CD4⁺-лимфоциты, Treg, Th17, Tact, CD39, CD73, ВЗК, дети**Финансирование:** исследование проведено в рамках государственного задания Минздрава России, № АААА-А19-119013090093-2.**Благодарности:** авторы выражают благодарность всем пациентам, участвовавшим в исследовании, а также признательность за сотрудничество коллегам из гастроэнтерологического отделения с гепатологической группой национального медицинского исследовательского центра здоровья детей.**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом ФГАУ «НИИЦ здоровья детей» МЗ РФ (протокол № 6 от 11 июня 2019 г.). Для всех участников исследования было получено информированное согласие родителей в соответствии с принципами Хельсинкской декларации.✉ **Для корреспонденции:** Татьяна Вячеславовна Радыгина
Ломоносовский проспект, д. 2/1, г. Москва, 119296, Россия; tvradygina@mail.ru**Статья получена:** 22.06.2022 **Статья принята к печати:** 16.07.2022 **Опубликована онлайн:** 30.07.2022**DOI:** 10.24075/vrgmu.2022.039CONTENT OF CD4⁺ CELLS EXPRESSING CD39/CD73 ECTONUCLEOTIDASES IN CHILDREN WITH INFLAMMATORY BOWEL DISEASESRadygina TV¹✉, Petrichuk SV¹, Kuptsova DG¹, Potapov AS^{1,2}, Illarionov AS², Anushenko AO¹, Kurbatova OV¹, Semikina EL^{1,2}¹ National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russia² Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

The regulation of TNF inhibitor therapy-associated immune responses in inflammatory bowel diseases (IBD) in children remains an urgent problem. The study aimed at analyzing the expression of CD39/CD73 endonucleotidases by different subsets of peripheral blood T cells in children with IBD including Crohn's disease ($n = 34$) and ulcerative colitis ($n = 33$) having received TNF inhibitors in comparison with conditionally healthy children ($n = 45$). Lymphocyte subsets including regulatory T cells (Treg, CD4⁺CD127^{low}CD25^{high}), activated T cells (Tact, CD4⁺CD25⁺CD127^{high}) and Th17 cells (CD4⁺CD161⁺CD3⁺) were studied by flow cytometry. The results are presented as medians (Me) and quartiles (Q_{25} – Q_{75}). In children with IBD the highest and the lowest relative counts of CD39⁺ cells were found in Treg and Tact subsets — 31% (15–38) and 4% (1–7), respectively. The highest relative counts of CD73⁺ cells were found in Tact — 13% (8–21). The CD39 and CD73 expression ratio in patients with IBD, and in the control group as well, depended on particular subset. CD39 expression in Treg, Tact and Th17 of patients with IBD was not age-dependent. Patients with acute Crohn's disease revealed decreased expression of CD39 in Treg compared with the control group (12% (9–23) vs 35% (28–39), respectively; $p = 10^{-6}$). Patients with Crohn's disease in remission revealed increased expression of CD39 in Treg compared with the acute of the disease (31% (27–40) vs 12% (9–23); $p = 9.4 \times 10^{-6}$). Patients with Crohn's disease in remission revealed no significant differences with the control group apart from reduced expression of CD73 by Treg in Crohn's disease. The results indicate significant association of CD39 and CD73 expression levels in particular subsets of CD4⁺ cells with the phase of the disease (acute vs remission) and, accordingly, with the anti-TNF regimen efficacy.

Keywords: lymphocyte subsets, CD4⁺ subsets, Treg, Th17, Tact, CD39, CD73, children, inflammatory bowel diseases**Funding:** the study was carried out on state assignment of the Ministry of Health of Russia, number АААА-А19-119013090093-2.**Acknowledgement:** the authors thank all patients for participation and acknowledge the Gastroenterology Department with Hepatology Group of the National Medical Research Center for Children's Health and its collaboration.**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Ethics Committee of the National Medical Research Center for Children's Health, Moscow (protocol № 6 dated June 11, 2019). The informed consent was submitted by all study participants.✉ **Correspondence should be addressed:** Tatiana V. Radygina
Lomonosovsky prospekt, 2/1, Moscow, 119296, Russia; tvradygina@mail.ru**Received:** 22.06.2022 **Accepted:** 16.07.2022 **Published online:** 30.07.2022**DOI:** 10.24075/brsmu.2022.039

Изучение процессов патогенеза воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК), а также поиск новых подходов для прогноза ответа пациентов на терапию является актуальной проблемой в современной

педиатрии. В Российской Федерации распространенность ВЗК составляет 5,1 случай на 100 тысяч населения [1]. Особую обеспокоенность у педиатров вызывает прирост заболеваемости ВЗК среди детей за последнее десятилетие

на 30% и выявление тяжелых форм заболевания в раннем детском возрасте [2, 3]. Известно, что к возникновению ВЗК приводит сочетание нескольких неблагоприятных факторов: генетическая предрасположенность, дисфункция иммунной системы, нарушения кишечной микрофлоры, воздействие вредных факторов окружающей среды [4]. Однако наиболее значимыми факторами развития ВЗК считают нарушения в иммунной системе. Показана значимость определения Th17-лимфоцитов (Th17) и регуляторных Т-клеток (Treg) для оценки тяжести патологического процесса и эффективности применяемой терапии при ВЗК [5, 6]. Наивные Т-клетки могут дифференцироваться в Th1, Th2, Th17 и Treg под действием цитокинов, продуцируемых антигенпрезентирующими клетками. Th17 и Treg имеют общий сигнальный путь, опосредованный TGF β . В присутствии IL6, IL21, TGF β наивные CD4⁺-Т-клетки дифференцируются в Th17 в отсутствие же провоспалительных цитокинов — в Treg-клетки. Нарушение баланса между Th17 и Treg приводит к возникновению различных аутоиммунных заболеваний, включая ВЗК [7, 8].

В последнее десятилетие идет интенсивное изучение пуринаргической системы регуляции, оказывающей непосредственное влияние на иммунную систему. Гипотеза о пуринаргической передаче сигнала была предложена

Джеффри Бернстокком еще в 1972 г. [9]. В современном понимании внеклеточная аденозинтрифосфорная кислота (eATP) играет роль провоспалительного медиатора, участвующего в регуляции клеточного метаболизма, миграции, пролиферации и апоптозе клеток через сигнальные пути, запускаемые рецепторами P2Y и P2X [10, 11]. Ферменты эктонуклеотидазы (CD39, или ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1, E-NTPDase1; CD73, или ecto-5'-nucleotidase, Ecto5'NTase) участвуют в последовательном дефосфорилировании ATP до аденозина, обладающего противовоспалительными свойствами [11]. Дисбаланс между количеством eATP и аденозина может приводить к активации воспалительного процесса [12]. Эктонуклеотидаза CD39 играет важную роль в регуляции воспаления кишечника: высокая экспрессия CD39 в циркулирующих Treg коррелирует с клинической и эндоскопической ремиссией у пациентов с ВЗК [13, 14]. Показано также, что однонуклеотидные полиморфизмы, связанные со снижением экспрессии CD39, повышают риск возникновения болезни Крона [15].

Эктонуклеотидазы экспрессируются в различных популяциях лимфоцитов, в том числе в Treg и Th17 клетках. Показано, что 90% TregFoxp3⁺ несут на своей поверхности CD39 [16]. Популяция Treg неоднородна по экспрессии CD39. Т-клетки CD4⁺CD25^{high}CD39⁺ и

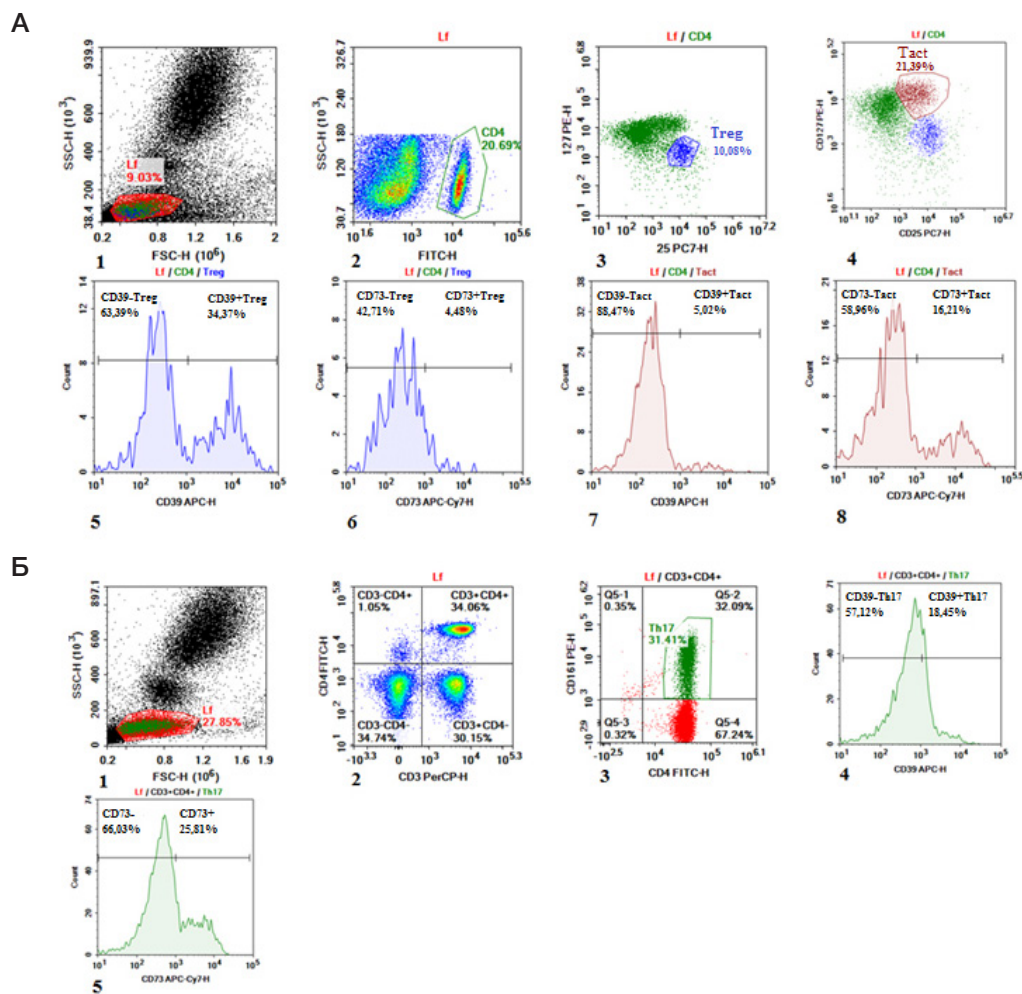


Рис. 1. Стратегия последовательного гейтирования Treg, Tact, Th17, экспрессирующих CD39, CD73. **А.** Стратегия последовательного гейтирования для Treg / Tact. 1 — выделение «лимфоидного» региона по параметрам прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния; 2 — выделение CD4 позитивных лимфоцитов; 3 — выделение Treg по маркерам (CD4⁺CD127^{low}CD25^{high}); 4 — выделение Tact по маркерам (CD4⁺CD25⁺CD127^{high}); 5 — определение CD39Treg; 6 — определение CD73Treg; 7 — определение CD39Tact; 8 — определение CD73Tact. **Б.** Стратегия последовательного гейтирования для Th17. 1 — выделение «лимфоидного» региона по параметрам прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния; 2 — выделение двойной позитивной популяции по маркерам CD3 и CD4; 3 — выделение Th17-популяции; 4 — определение CD39Th17; 5 — определение CD73Th17

Таблица 1. Число клеток, экспрессирующих эктонуклеотидазы CD39 и CD73, в популяциях Т-лимфоцитов у пациентов с ВЗК и в группе сравнения

Фермент Показатели	Пациенты с ВЗК (n = 67)				Группа сравнения (n = 45)				p
	CD39		CD73		CD39		CD73		
	Me (Q _{0,25} –Q _{0,75})	Min–Max	Me (Q _{0,25} –Q _{0,75})	Min–Max	Me (Q _{0,25} –Q _{0,75})	Min–Max	Me (Q _{0,25} –Q _{0,75})	Min–Max	
Treg, %	31,2 (14,8–37,8)	6–58	5,0 (3,0–8,3)	0-15	35 (27,8–39,4)	19–49	8,1 (6,9–12,2)	2–39	p39 = 0,023 p73 = 0,000
Tact, %	3,9 (1,1–6,7)	0–14	12,9 (8,0–21,1)	2-30	5 (4,4–7,4)	3–11	17,6 (11,9–21,5)	8–35	p39 = 0,001 p73 = 0,021
Th17,%	10,4 (5,2–16,8)	0–29	7,7 (4,7–11,4)	1-26	9,6 (8,6–12,1)	6–24	10,2 (7,3–14,4)	3–33	p39 = 0,771 p73 = 0,007

Примечание: p39 — уровень достоверности между группой пациентов с ВЗК и группой сравнения, экспрессирующих CD39 в разных популяциях Т-клеток; p73 — уровень достоверности между группой пациентов с ВЗК и группой сравнения, экспрессирующих CD73 в разных популяциях Т-клеток.

CD4⁺CD25^{high}CD39⁺, как было показано при множественном склерозе, подавляли пролиферацию и продукцию Т-эффекторами IFN γ [17]. Но только клетки с фенотипом CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺CD39⁺ подавляли продукцию IL17, в то время как CD4⁺CD25^{high}CD39-Treg продуцировали IL17 [17]. Необходимо отметить, что популяция Th17-клеток также неоднородна по экспрессии CD39 и, помимо популяции, оказывающей провоспалительное воздействие на окружающие клетки, есть еще популяция супрессорных Th17-лимфоцитов (supTh17), экспрессирующая высокие уровни CD39 и способствующая продукции аденозина. SupTh17 определяются в периферической крови и в ткани собственной пластинки кишечника у здоровых людей, тогда как их количество снижено у пациентов с БК, что подчеркивает их важность для контроля воспаления в кишечнике [18, 19]. Большинство исследований, посвященных изучению пуринергической передачи сигнала, ранее было проведено у взрослых пациентов с ВЗК [12–14].

В связи с этим, целью настоящего исследования было оценить количество клеток, экспрессирующих эктонуклеотидазы (CD39/CD73) в субпопуляциях CD4⁺-лимфоцитов у детей с ВЗК.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Было обследовано 67 пациентов с ВЗК (с болезнью Крона (БК) — 34 пациента, язвенным колитом (ЯК) — 33 пациента) в возрасте 3,4–18 лет, прошедших терапию блокаторами

TNF. По течению заболевания дети были разделены на группы: группа 1 — обострение БК (n = 18), группа 2 — ремиссия БК (n = 16), группа 3 — обострение ЯК (n = 22), группа 4 — ремиссия ЯК (n = 11). Разделение пациентов на группы проводили с использованием педиатрических индексов активности болезни PCDAI для БК (≤ 10 — ремиссия, > 10 — обострение) и PUCAI для ЯК (≤ 10 — ремиссия, > 10 — обострение). Группу сравнения (группа 5, n = 45) составили условно здоровые дети в возрасте 3,7–17,5 лет. Критерии включения пациентов в группу 5: отсутствие в стандартном клиническом и биохимическом лабораторном исследовании результатов, выходящих за диапазон референсных значений; отсутствие каких-либо острых или обострения хронических состояний; отсутствие травм; отсутствие в анамнезе аутоиммунных, онкологических и психических заболеваний. Образцы венозной крови для иммунологических тестов получали путем забора из локтевой вены натощак в пробирки BD Vacutainer® с антикоагулянтом K2ЭДТА. Иммунофенотипирование лимфоцитов и оценку экспрессии рецепторов пуринергической передачи сигнала (CD39 и CD73) в Th17-лимфоцитах, в Treg и Т-активированных лимфоцитах (Tact) проводили методом проточной лазерной цитофлуориметрии (Novocyte, ACEA Biosciences; США). Использовали моноклональные антитела, конъюгированные с различными флуорохромами: CD4-FITC (cat. A07750, Beckman Coulter; США), CD127-PE (cat. IM 10980U, Beckman Coulter; США), CD25-PC7 (cat. A52882, Beckman Coulter; США), CD161-PE (cat. IM

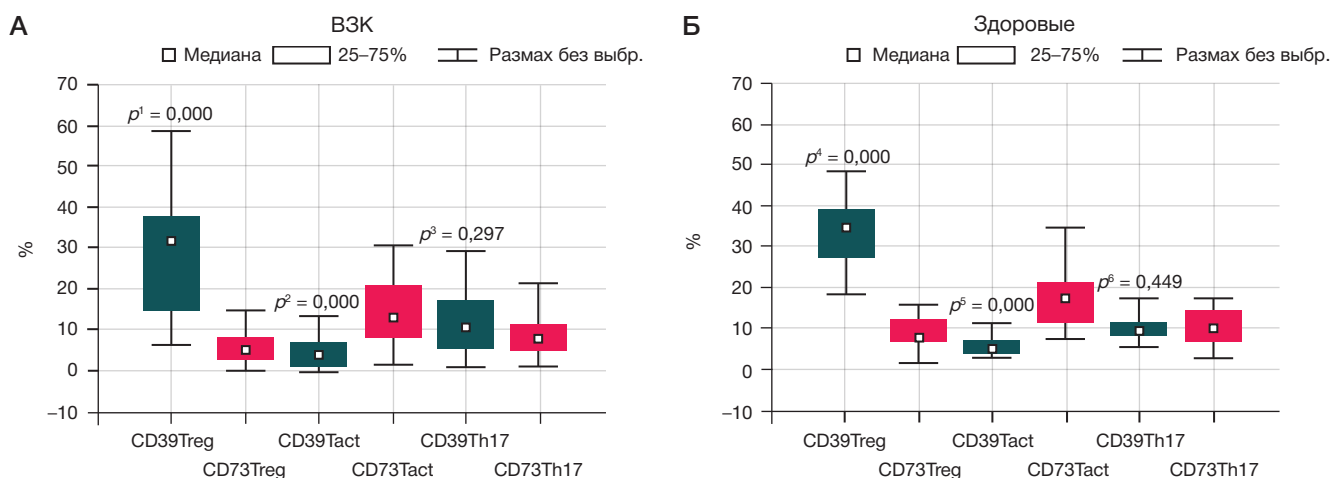


Рис. 2. Число клеток, экспрессирующих CD39 и CD73, в популяциях CD4⁺-лимфоцитов у пациентов с ВЗК и в группе сравнения. **А.** p¹ — уровень достоверности между CD39Treg и CD73Treg, p² — уровень достоверности между CD39Tact и CD73Tact, p³ — уровень достоверности между CD39Th17 и CD73Th17. **Б.** p⁴ — уровень достоверности между CD39Treg и CD73Treg, p⁵ — уровень достоверности между CD39Tact и CD73Tact, p⁶ — уровень достоверности между CD39Th17 и CD73Th17

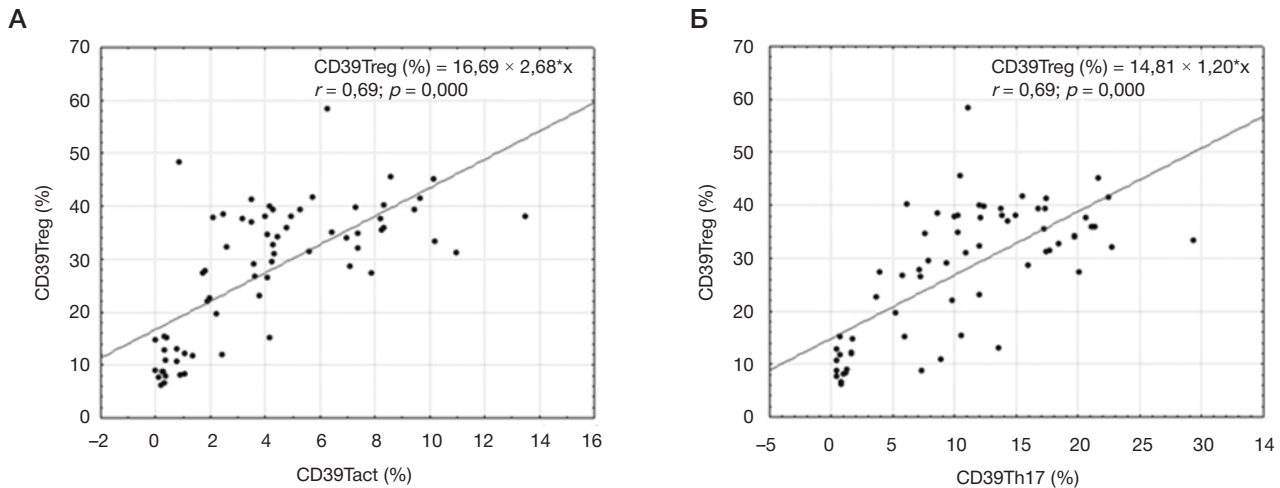


Рис. 3. Зависимость экспрессии CD39 в Treg от Tact (А) и Th17 (Б) у пациентов с ВЗК

3450, Beckman Coulter; США), CD3-PC5 (cat. A07749, Beckman Coulter; США), CD39-APC-Cy7 (Clone A1, cat. RT2241130 Sony Biotechnology; США), CD73-APC-Cy7 (Clone AD2, cat. RT2320110; Sony Biotechnology, США). Для лизирования эритроцитов использовали лизирующий раствор BD FACS™ Lysing Solution (BD Biosciences; США), длительность инкубации с которым в темноте при комнатной температуре не превышала 10–12 мин. Выделение популяций клеток, экспрессирующих CD39 и CD73 в регуляторных Т-клетках ($CD4^+CD127^{low}CD25^{high}$), Tact-лимфоцитах ($CD4^+CD25^+CD127^{high}$), Th17-лимфоцитах ($CD4^+CD161^+CD3^+$) проводили с помощью пошагового гейтирования (рис. 1).

Статистическую обработку полученных данных выполняли с использованием программы Statistica 10.0 (StatSoft; США). Описательная статистика количественных

признаков представлена в формате: медиана (нижние и верхние квартили) — Me ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$), минимум/максимум (Min/Max). Достоверность различий между группами оценивали с использованием непараметрического U-критерия Манна–Уитни. Различия в распределениях оценивали с помощью критерия χ^2 . Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

CD39 и CD73 в популяциях Т-лимфоцитов у детей с ВЗК в сравнении с группой условно здоровых детей

Анализ числа клеток с экспрессией CD39 и CD73 у детей с ВЗК показал, что наибольшее число клеток CD39+

Таблица 2. Число клеток, экспрессирующих эктонуклеотидазы CD39 и CD73, в популяциях Т-лимфоцитов в группах пациентов с БК, ЯК и в группе сравнения

	БК обострение	БК ремиссия	ЯК обострение	ЯК ремиссия	Здоровые дети	БК	ЯК
Показатель	Группа 1 ($n = 18$) Me ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$)	Группа 2 ($n = 16$) Me ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$)	Группа 3 ($n = 22$) Me ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$)	Группа 4 ($n = 11$) Me ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$)	Группа 5 ($n = 45$) Me ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$)	p_{12}	p_{34}
CD39Treg, %	12,48 (8,64–22,53)	30,71 (26,62–39,56)	32,77 (14,60–39,19)	35,51 (33,91–37,70)	35 (27,8–39,4)	0	0,355
p	0	0,556	0,198	0,627			
CD73Treg, %	3,90 (3,25–5,91)	5,87 (2,50–8,86)	4,80 (3,20–7,00)	5,45 (1,97–12,68)	8,1 (6,9–12,2)	0,606	0,836
p	0	0,022	0,001	0,072			
CD39Tact, %	0,59 (0,30–3,20)	4,18 (2,92–7,35)	4,08 (1,36–6,05)	7,00 (2,50–8,28)	5 (4,4–7,4)	0,001	0,204
p	0	0,158	0,025	0,76			
CD73Tact, %	11,50 (8,04–15,18)	13,07 (8,26–23,47)	13,10 (8,00–18,23)	16,28 (8,78–21,60)	17,6 (11,9–21,5)	0,423	0,585
p	0,014	0,325	0,066	0,427			
CD39Th17, %	3,71 (0,71–12,10)	9,60 (8,54–10,3)	14,08 (1,72–17,31)	17,26 (8,60–20,64)	9,6 (8,6–12,1)	0,092	0,462
p	0,014	0,486	0,062	0,059			
CD73Th17, %	6,30 (4,32–10,20)	8,22 (3,50–16,54)	6,50 (5,40–9,05)	8,30 (3,00–18,70)	10,2 (7,3–14,4)	0,224	0,418
p	0,008	0,489	0,002	0,569			

Примечание: p_{12} — уровень достоверности между группами 1 и 2 по экспрессии CD39 / CD73 в популяциях $CD4^+$; p_{34} — уровень достоверности между группами 3 и 4 по экспрессии CD39 / CD73 в популяциях $CD4^+$; p — уровень достоверности между группами пациентов с БК и ЯК и группой сравнения, экспрессирующих CD39 / CD73 в разных популяциях Т-клеток.

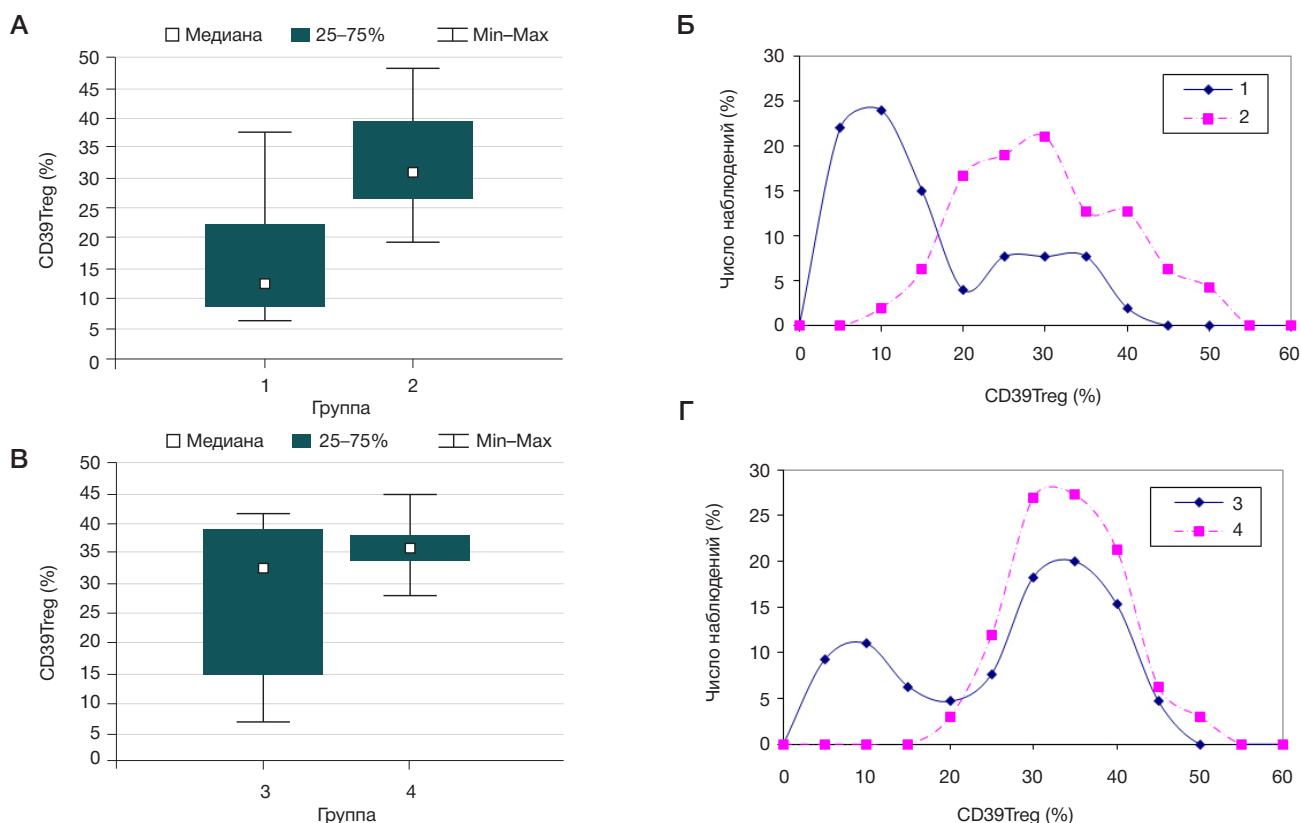


Рис. 4. Относительное число клеток, экспрессирующих CD39 в Treg, в группах 1 и 2 пациентов с БК (А, Б) и в группах 3 и 4 пациентов с ЯК (В, Г)

выявлено в популяции Treg и составило 6–58% от Treg, наименьшее значение — в популяции Tact и составляет 0–14% от Tact. Экспрессия CD73 наиболее выражена в Tact — 2–30% от Tact (табл. 1). В группе сравнения наблюдали аналогичные соотношения по экспрессии CD39 и CD73 в популяциях Т-лимфоцитов (табл. 1).

Соотношение экспрессии CD39 и CD73 у пациентов с ВЗК, так же как и в группе сравнения, зависело от популяции клеток: в популяции Treg экспрессия CD39 (CD39Treg) была достоверно выше, чем CD73 (CD73Treg) ($p = 0,000$), а в популяции Tact экспрессия CD39 соответственно достоверно ниже CD73 ($p = 0,000$) (рис. 2А). Число клеток с экспрессией ферментов CD39 и CD73 в Th17-лимфоцитах достоверно не отличалось (табл. 1; рис. 2Б).

У пациентов с ВЗК относительно группы сравнения выявлено достоверное снижение числа клеток с экспрессией CD39 и CD73 в Treg клетках и Tact (табл. 1). Что касается Th17-лимфоцитов, то по экспрессии CD39 группы не различались, а экспрессия CD73 была достоверно ниже в группе детей с ВЗК.

Выявлена прямая корреляционная зависимость между относительным количеством CD39Treg и CD39Tact ($r = 0,69$; $p = 0,000$; рис. 3А), CD39Treg и CD39Th17 ($r = 0,69$; $p = 0,000$; рис. 3Б) у пациентов с ВЗК. Аналогичные зависимости были выявлены для CD73: число CD73Treg коррелирует с CD73Tact ($r = 0,45$; $p = 0,000$); CD73Treg с CD73Th17 ($r = 0,46$; $p = 0,000$).

Анализ показал, что экспрессия CD39 в Treg, Tact и Th17 у пациентов с ВЗК не зависела от возраста ребенка. В то же время в группе сравнения выявлена обратная зависимость экспрессии CD39 от возраста для Th17-лимфоцитов ($r = -0,39$; $p = 0,009$). Группы пациентов с ВЗК и условно здоровых детей не различались по возрасту ($p = 0,435$).

Экспрессия CD73 в Th17-лимфоцитах у пациентов с ВЗК, так же как и в группе сравнения, повышалась с

возрастом ($r = 0,43$; $p = 0,000$).

Длительность заболевания у пациентов в группах составляла от 5 месяцев до 7,7 лет, а длительность проводимой терапии — 2–288 недели. Зависимости количества клеток с экспрессией CD39/CD73 от длительности заболевания и длительности терапии выявлено не было.

Экспрессия CD39/CD73 в популяциях CD4⁺-клеток в группах детей при обострении ВЗК и ремиссии заболевания

Был проведен сравнительный анализ экспрессии CD39 и CD73 в популяциях CD4⁺-лимфоцитов у пациентов с БК и ЯК при обострении (группа 1, группа 3) и при ремиссии заболевания (группа 2, группа 4) между собой и по сравнению с группой условно здоровых детей (группа 5) (табл. 2). Для пациентов с БК выявлено достоверное снижение относительного числа клеток с экспрессией CD39 в группе 1 по сравнению с группой 2 в популяциях Treg и Tact. В группе детей с БК при обострении (группа 1) было получено достоверное снижение экспрессии CD39 и CD73 в популяциях Treg, Tact, Th17 относительно группы 5 (табл. 2). Между группой пациентов с БК в ремиссии и группой сравнения достоверных различий выявлено не было, за исключением снижения экспрессии CD73 в Treg (табл. 2).

Для пациентов с ЯК выявлено достоверное снижение процента Tact, экспрессирующих CD39, в группе пациентов с обострением заболевания относительно группы 5. Кроме того, в группе пациентов с обострением ЯК было выявлено достоверное снижение экспрессии CD73 в Treg и Th17 по сравнению с группой условно здоровых детей (табл. 2). В то же время между группой пациентов с ЯК при ремиссии и группой сравнения достоверных различий получено не было.

Выявлены достоверные различия в экспрессии CD39 в Treg у пациентов с БК в состоянии обострения и ремиссии (рис. 4А). Из-за большого разброса показателей у детей с ЯК достоверных различий между группами 3 и 4 по экспрессии CD39 в Treg получено не было (рис. 4В). Графики на рис. 4Б и 4Г отражают распределение пациентов с БК (группы 1 и 2) и ЯК (группы 3 и 4) по экспрессии CD39 в Treg: в каждой группе выявляются пациенты с низкой и высокой частотой экспрессии. На графиках видно, что точка разделения пациентов в обострении с высокой и низкой экспрессией CD39 в Treg приходится на 20% клеток. При проведении анализа распределения пациентов с БК по количеству клеток с экспрессией CD39 в Treg было отмечено, что у 78% пациентов в обострении субпопуляция CD39Treg составляла менее 20% клеток (рис. 4Б). Напротив, в состоянии ремиссии у 82% пациентов субпопуляция CD39Treg составляла более 20% клеток (рис. 4В). В группе 3 у трети пациентов маркер CD39 в Treg экспрессировался менее чем в 20% клеток, у 67% — более 20% Treg (рис. 4Г). У 100% пациентов группы 4 CD39 экспрессировали более 20% Treg (рис. 4Г).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При изучении взрослых здоровых доноров показано, что уровень экспрессии CD39 в Treg может варьировать в диапазоне 2–60%, что отражается на способности этих клеток к гидролизу ATP [20]. Клетки доноров с большим числом CD39 в Treg осуществляют гидролиз ATP более эффективно. Нами было показано, что у здоровых детей экспрессия CD39 в Treg колеблется от 19–49%. Оценка содержания клеток с экспрессией эктонуклеотидаз в CD4⁺-лимфоцитах у детей с ВЗК, принимавших блокаторы TNF, показала, что экспрессия CD39 превалирует у пациентов в стадии ремиссии заболевания, что согласуется с данными других авторов [13].

Известно также, что лечение анти-TNF-препаратами у взрослых вызывало увеличение экспрессии CD39 в Treg [21]. В нашем исследовании группа пациентов в стадии обострения БК имела достоверно более низкие количества Treg с экспрессией CD39 по сравнению с группой пациентов в стадии ремиссии БК. При сравнении пациентов с БК и ЯК при обострении заболевания оказалось, что число пациентов, имеющих низкую экспрессию CD39 в Treg, больше при БК, чем при ЯК.

В одной из работ, посвященных оценке функциональной активности CD39 в Treg у пациентов с аутоиммунными гепатитами, показано снижение гидролиза ATP и образования аденозина [22]. Можно предположить, что у пациентов с ВЗК тоже снижена эффективность гидролиза ATP за счет снижения активности CD39. Этим можно объяснить

факт наличия пациентов с БК с высокой экспрессией CD39 в Treg при недостаточном эффекте от анти-TNF-терапии и обострении заболевания. Вероятнее всего, увеличение количества Treg, несущих на своей поверхности эктонуклеотидазу CD39, имеет компенсаторный характер и происходит в ответ на недостаточную активность фермента.

В нашем исследовании показано, что количество лимфоцитов субпопуляции supTh17, обладающих супрессорной активностью, у детей в обострении БК было достоверно ниже, чем в группе условно здоровых детей. Представляется перспективным определение supTh17-популяции в качестве дополнительного маркера состояний обострения/ремиссии. Кроме того, как у здоровых детей, так и у детей с ВЗК, количество данной популяции снижается с возрастом. Можно предположить, что снижение популяции supTh17 увеличивает вероятность развития воспалительного процесса с возрастом.

CD73 играет важную роль в поддержании гомеостаза кишечника [23–25]. На нокаут-мышях было продемонстрировано, что отсутствие CD73 приводит к выраженному воспалению толстой кишки и повреждению тканей у мышей [26]. В нашем исследовании у детей с ВЗК относительно группы сравнения выявлено снижение экспрессии CD73 в Treg, Tact, Th17. CD73 оказывает свою ферментативную активность, расщепляя AMP до аденозина, не только в виде заякоренного белка на мембране, но и в растворимой форме [27]. Возможно, что для оценки состояния пациента необходимо определять не только экспрессию CD73 в CD4⁺-клетках, но и исследовать активность его растворимой формы, которая, как показано, коррелирует с тяжестью воспалительного процесса [28].

ВЫВОДЫ

Результаты нашего исследования показывают, что число клеток, экспрессирующих эктонуклеотидазы CD39 и CD73 в популяциях CD4⁺-лимфоцитов, зависит от популяции клеток и в значительной степени связано с состоянием обострения или ремиссии, и, соответственно, с эффективностью проводимой анти-TNF-терапии. Большинство детей в стадии ремиссии ВЗК имеют высокий уровень CD4⁺-лимфоцитов с экспрессией эктонуклеотидаз, что способствует снижению активности воспаления за счет преобразования АТФ в аденозин. Однако случаи высокой экспрессии CD39 встречаются и в стадии обострения заболевания, что может быть связано с различной активностью экспрессируемого фермента. Мы полагаем, что дальнейшие исследования по оценке функциональной активности эктонуклеотидаз CD39 и CD73 в совокупности с количественными показателями могут быть информативны для прогноза и оценки эффективности анти-TNF-терапии при ВЗК.

Литература

- Burisch J, Pedersen N, Cukovic-Cavka S, et al. East-West gradient in the incidence of inflammatory bowel disease in Europe: the ECCOEpiCom inception cohort. *Gut*. 2014; 63 (4): 588–97.
- Benchimol EI, Guttman A, Griffiths AM, et al. Increasing incidence of paediatric inflammatory bowel disease in Ontario, Canada: evidence from health administrative data. *Gut*. 2009; 58: 1490–7.
- Papamichael K, Gils A, Rutgeerts P, Levesque BG, Vermeire S, Sandborn WJ, et al. Role for therapeutic drug monitoring during induction therapy with TNF antagonists in IBD: evolution in the definition and management of primary nonresponse. *Inflamm. Bowel Dis*. 2015; 21: 182–97.
- Князев О. В., Шкурко Т. В., Каграманова А. В., Веселов А. В., Никонов Е. Л. Эпидемиология воспалительных заболеваний кишечника. Современное состояние проблемы. Доказательная гастроэнтерология. 2020; 9 (2): 66–73. Доступно по ссылке: <https://doi.org/10.17116/dokgastro2020902166>.
- Yan JB, Luo MM, Chen ZY, He BH. The function and role of the Th17/Treg cell balance in Inflammatory bowel disease. *J Immunol Res*. 2020; 2020: 8813558. DOI: 10.1155/2020/8813558.

6. Петричук С. В., Мирошкина Л. В., Семикина Е. Л., Топтыгина А. П., Потапов А. С., Цимбалова Е. Г. и др. Показатели популяционного состава лимфоцитов как предикторы эффективности терапии ингибитором TNF α у детей с воспалительными заболеваниями кишечника. Медицинская иммунология. 2018; 20 (5): 721–30. Доступно по ссылке: <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2018-5-721-730>.
7. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom T. B, Oukka M, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006; 441 (7090): 235–8.
8. Lee GR. The balance of Th17 versus Treg cells in autoimmunity. *Int J Mol Sci*. 2018. 19: 730. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms19030730>.
9. Burnstock G. Purinergic nerves. *Pharmacological Reviews*. 1972; 24 (3): 509–81.
10. Kukulski F, et al. Impact of ectoenzymes on p2 and p1 receptor signaling. *Adv Pharmacol*. 2011; 61: 263–99. PubMed: 21586362.
11. Virgilio FD, Sarti AC, Silva RC. Purinergic signaling, DAMPs, and inflammation. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2020; 318 (5): 832–5. Available from: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00053.2020>.
12. Faas MM, Sáez T, de Vos P. Extracellular ATP and adenosine: the yin and yang in immune responses? *Mol Aspects Med*. 2017; 55: 9–19. DOI: 10.1016/j.mam.2017.01.002.
13. Vuerich M, Mukherjee S, Robson SC, Longhi MS. Control of gut inflammation by modulation of purinergic signaling. *Front Immunol*. 2020; 11: 1882. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01882.
14. Gibson DJ, Elliott L, McDermott E, Tosetto M, Keegan D, Byrne K, et al. Heightened expression of CD39 by regulatory T lymphocytes is associated with therapeutic remission in Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2015; 21: 2806–14.
15. Friedman DJ, Kunzli BM, A-Rahim YI, Sevigny J, Berberat PO, Enyoji K, et al. From the cover: CD39 deletion exacerbates experimental murine colitis and human polymorphisms increase susceptibility to inflammatory bowel disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009; 106: 16788–93.
16. Zeng J, Ning Z, Wang Y, Xiong H. Implications of CD39 in immune-related diseases. *Int Immunopharmacol*. 2020; 89 (Pt A): 107055. DOI: 10.1016/j.intimp.2020.107055.
17. Fletcher JM, Loneragan R, Costelloe L, Kinsella K, Moran B, O'Farrelly C, et al. CD39Foxp3 regulatory T Cells suppress pathogenic Th17 cells and are impaired in multiple sclerosis. *The Journal of Immunology*. 2009; 183: 7602–10.
18. Longhi MS, Moss A, Bai A, Wu Y, Huang H, Cheifetz A, et al. Characterization of human CD39+ Th17 cells with suppressor activity and modulation in inflammatory bowel disease. *PLoS ONE*. 2014; 9: e87956. DOI: 10.1371/journal.pone.0087956.
19. Fernández D, Flores-Santibáñez F, Neira J, Osorio-Barrios F, Tejón G, Nuñez S, et al. Purinergic signaling as a regulator of Th17 cell plasticity. *PLoS ONE*. 2016; 11: e0157889. DOI: 10.1371/journal.pone.0157889.
20. Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, Stenjak A, Diamantini A, Giometto R, et al. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+Treg cells: Hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood*. 2007; 110 (4): 1225–32.
21. Gibson DJ, Elliott L, McDermott E, Tosetto M, Keegan D, Byrne K, et al. Heightened expression of CD39 by regulatory T lymphocytes is associated with therapeutic remission in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2015; 21: 2806–14. DOI: 10.1097/MIB.0000000000000566.
22. Grant CH R, Liberal R, Holder BS, Cardone J, Ma Y, Robson SC, et al. Dysfunctional CD39(POS) regulatory T cells and aberrant control of T-helper type 17 cells in autoimmune hepatitis. *Hepatology*. 2014; 59 (3): 1007–15. DOI: 10.1002/hep.26583.
23. Louis NA, Robinson AM, MacManus CF, Karhausen J, Scully M, Colgan SP. Control of IFN- α A by CD73: implications for mucosal inflammation. *J Immunol*. 2000; 180: 4246–55. DOI: 10.4049/jimmunol.180.6.4246.
24. Sotnikov I, Louis NA. CD73-dependent regulation of interferon alpha and interleukin-10 in the inflamed mucosa. *Sci World J*. 2010; 10: 2167–80. DOI: 10.1100/tsw.2010.203.
25. Colgan SP, Eltzschig HK, Eckle T, Thompson LF. Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Purinergic Signal*. 2006; 351–60. DOI: 10.1007/s11302-005-5302-5.
26. Bynoe MS, Waickman AT, Mahamed DA, Mueller C, Mills JH, Czopik A. CD73 is critical for the resolution of murine colonic inflammation. *BioMed Research International*. 2012, Article ID 260983, 13 pages, 2012. Available from: <https://doi.org/10.1155/2012/260983>.
27. Schneider E, Rissiek A, Winzer R, Puig B, Rissiek B, Haag F, et al. Generation and function of non-cell-bound CD73 in inflammation. *Frontiers in Immunology*. 2019; 10, article 1729. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01729.
28. Maksimow M, Lea K, Nieminen A, Kylänpää L, Aalto K, et al. Early prediction of persistent organ failure by soluble CD73 in patients with acute pancreatitis. *Critical Care Medicine*. 2014; 42 (12): 2556–64. DOI: 10.1097/CCM.0000000000000550.

References

1. Burisch J, Pedersen N, Cukovic-Cavka S, et al. East-West gradient in the incidence of inflammatory bowel disease in Europe: the ECCOEpiCom inception cohort. *Gut*. 2014; 63 (4): 588–97.
2. Benchimol EI, Guttman A, Griffiths AM, et al. Increasing incidence of paediatric inflammatory bowel disease in Ontario, Canada: evidence from health administrative data. *Gut*. 2009; 58: 1490–7.
3. Papamichael K, Gils A, Rutgeerts P, Levesque BG, Vermeire S, Sandborn WJ, et al. Role for therapeutic drug monitoring during induction therapy with TNF antagonists in IBD: evolution in the definition and management of primary nonresponse. *Inflamm. Bowel Dis*. 2015; 21: 182–97.
4. Kniazev OV, Shkurko TV, Kagramanova AV, Veselov AV, Nikonov EL. Epidemiology of inflammatory bowel disease. State of the problem (review). *Russian Journal of Evidence-Based Gastroenterology*. 2020; 9 (2): 66–73. Russian.
5. Yan JB, Luo MM, Chen ZY, He BH. The function and role of the Th17/Treg cell balance in Inflammatory bowel disease. *J Immunol Res*. 2020; 2020: 8813558. DOI: 10.1155/2020/8813558.
6. Petrichuk SV, Miroshkina LV, Semikina EL, Topotygina AP, Potapov AS, Tsimbalova EG, et al. Indicators of the lymphocyte subsets as efficiency predictors of therapy with inhibitors of TNF α in children with inflammatory bowel disease. *Medical Immunology*. 2018; 20 (5): 721–30. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2018-5-721-730>. Russian.
7. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom T. B, Oukka M, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006; 441 (7090): 235–8.
8. Lee GR. The balance of Th17 versus Treg cells in autoimmunity. *Int J Mol Sci*. 2018. 19: 730. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms19030730>.
9. Burnstock G. Purinergic nerves. *Pharmacological Reviews*. 1972; 24 (3): 509–81.
10. Kukulski F, et al. Impact of ectoenzymes on p2 and p1 receptor signaling. *Adv Pharmacol*. 2011; 61: 263–99. PubMed: 21586362.
11. Virgilio FD, Sarti AC, Silva RC. Purinergic signaling, DAMPs, and inflammation. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2020; 318 (5): 832–5. Available from: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00053.2020>.
12. Faas MM, Sáez T, de Vos P. Extracellular ATP and adenosine: the yin and yang in immune responses? *Mol Aspects Med*. 2017; 55: 9–19. DOI: 10.1016/j.mam.2017.01.002.
13. Vuerich M, Mukherjee S, Robson SC, Longhi MS. Control of gut inflammation by modulation of purinergic signaling. *Front Immunol*. 2020; 11: 1882. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01882.
14. Gibson DJ, Elliott L, McDermott E, Tosetto M, Keegan D, Byrne K, et al. Heightened expression of CD39 by regulatory T lymphocytes

- is associated with therapeutic remission in Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2015; 21: 2806–14.
15. Friedman DJ, Kunzli BM, A-Rahim YI, Sevigny J, Berberat PO, Enjyoji K, et al. From the cover: CD39 deletion exacerbates experimental murine colitis and human polymorphisms increase susceptibility to inflammatory bowel disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009; 106: 16788–93.
 16. Zeng J, Ning Z, Wang Y, Xiong H. Implications of CD39 in immune-related diseases. *Int Immunopharmacol*. 2020; 89 (Pt A): 107055. DOI: 10.1016/j.intimp.2020.107055.
 17. Fletcher JM, Loneragan R, Costelloe L, Kinsella K, Moran B, O'Farrelly C, et al. CD39Foxp3 regulatory T Cells suppress pathogenic Th17 cells and are impaired in multiple sclerosis. *The Journal of Immunology*. 2009; 183: 7602–10.
 18. Longhi MS, Moss A, Bai A, Wu Y, Huang H, Cheifetz A, et al. Characterization of human CD39+ Th17 cells with suppressor activity and modulation in inflammatory bowel disease. *PLoS ONE*. 2014; 9: e87956. DOI: 10.1371/journal.pone.0087956.
 19. Fernández D, Flores-Santibáñez F, Neira J, Osorio-Barrios F, Tejón G, Nuñez S, et al. Purinergic signaling as a regulator of Th17 cell plasticity. *PLoS ONE*. 2016; 11: e0157889. DOI: 10.1371/journal.pone.0157889.
 20. Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, Sternjak A, Diamantini A, Giometto R, et al. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+Treg cells: Hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood*. 2007; 110 (4): 1225–32.
 21. Gibson DJ, Elliott L, McDermott E, Tosetto M, Keegan D, Byrne K, et al. Heightened expression of CD39 by regulatory T lymphocytes is associated with therapeutic remission in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2015; 21: 2806–14. DOI: 10.1097/MIB.0000000000000566.
 22. Grant Ch R, Liberal R, Holder BS, Cardone J, Ma Y, Robson SC, et al. Dysfunctional CD39(POS) regulatory T cells and aberrant control of T-helper type 17 cells in autoimmune hepatitis. *Hepatology*. 2014; 59 (3): 1007–15. DOI: 10.1002/hep.26583.
 23. Louis NA, Robinson AM, MacManus CF, Karhausen J, Scully M, Colgan SP. Control of IFN-alphaA by CD73: implications for mucosal inflammation. *J Immunol*. 2000; 180: 4246–55. DOI: 10.4049/jimmunol.180.6.4246.
 24. Sotnikov I, Louis NA. CD73-dependent regulation of interferon alpha and interleukin-10 in the inflamed mucosa. *Sci World J*. 2010; 10: 2167–80. DOI: 10.1100/tsw.2010.203
 25. Colgan SP, Eltzschig HK, Eckle T, Thompson LF. Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Purinergic Signal*. 2006; 351–60. DOI: 10.1007/s11302-005-5302-5.
 26. Bynoe MS, Waickman AT, Mahamed DA, Mueller C, Mills JH, Czopik A. CD73 is critical for the resolution of murine colonic inflammation. *BioMed Research International*. 2012, Article ID 260983, 13 pages, 2012. Available from: <https://doi.org/10.1155/2012/260983>.
 27. Schneider E, Rissiek A, Winzer R, Puig B, Rissiek B, Haag F, et al. Generation and function of non-cell-bound CD73 in inflammation. *Frontiers in Immunology*. 2019; 10, article 1729. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01729.
 28. Maksimow M, Lea K, Nieminen A, Kylänpää L, Aalto K, et al. Early prediction of persistent organ failure by soluble CD73 in patients with acute pancreatitis. *Critical Care Medicine*. 2014; 42 (12): 2556–64. DOI: 10.1097/CCM.0000000000000550.

УРОВЕНЬ АНДРОГЕНОВ В КРОВИ И Фолликулярной жидкости у женщин с бесплодием и сниженным овариальным резервом в программах ВРТ

А. А. Гависова , М. А. Шевцова, С. В. Киндышева, Н. Л. Стародубцева, В. Е. Франкевич, Т. А. Назаренко, Н. В. Долгушина

Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени В. И. Кулакова, Москва, Россия

Концентрация андрогенов в образцах фолликулярной жидкости у пациенток в программах вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) может быть связана с процессами оогенеза и эмбриогенеза. Целью исследования было проанализировать связь уровня андрогенов в плазме крови и фолликулярной жидкости у пациенток с бесплодием и сниженным овариальным резервом яичников в программах ВРТ. Проведено одномоментное исследование в параллельных группах 300 пациенток 18–42 лет с бесплодием с 2019 по 2021 гг., обратившихся для проведения программы ЭКО/ИКСИ и ПЭ. Определяли андрогенный профиль в плазме крови и фолликулярной жидкости методом масс-спектрометрии жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС/МС). Полученные результаты показали, что андрогены в плазме крови и фолликулярной жидкости, а именно уровни ДГЭА-С, андростендиона и общего тестостерона, могут быть ранними маркерами снижения овариального резерва (СОР) у женщин с бесплодием. Статистически значимая корреляционная связь между уровнями андрогенов в крови и фолликулярной жидкости свидетельствует об их вкладе в формирование снижения овариального резерва. Таким образом, при сниженном овариальном резерве выявлено снижение концентрации андрогенов в плазме крови и в фолликулярной жидкости, что свидетельствует о роли андрогенов в процессах фолликулогенеза, таких как тестостерон и андростендион.

Ключевые слова: андрогены, андрогенный дефицит, тестостерон, дегидроэпиандростерон, андростендион, репродуктивный возраст, бесплодие, ВРТ, ВЭЖХ-МС/МС, фолликулярная жидкость

Вклад авторов: А. А. Гависова, Н. В. Долгушина — концепция и дизайн исследования; А. А. Гависова, М. А. Шевцова — сбор и обработка материала, обзор литературы, написание статьи; С. В. Киндышева — лабораторная постановка и статистическая обработка материала; Н. Л. Стародубцева, В. Е. Франкевич, Т. А. Назаренко, Н. В. Долгушина — редактирование.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ Акушерства гинекологии и перинатологии им. В. И. Кулакова» (протокол № 2 от 07 февраля 2019 г.); все участники подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Алла Анатольевна Гависова
ул. Академика Опарина, д. 4, г. Москва, 117997; gaviiala@ya.ru

Статья получена: 29.07.2022 **Статья принята к печати:** 13.08.2022 **Опубликована онлайн:** 19.08.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.041

ANDROGEN LEVELS IN BLOOD AND FOLLICULAR FLUID OF IVF PATIENTS WITH DIMINISHED OVARIAN RESERVE

Gavisova AA , Shevtsova MA, Kindysheva SV, Starodubtseva NL, Frankevich VE, Nazarenko TA, Dolgushina NV

Kulakov national medical research center for obstetrics, gynecology and perinatology, Moscow, Russia

Androgen concentrations in follicular fluid samples collected from patients undergoing in vitro fertilization (IVF) may provide useful clinical indicators. This study aimed to analyze possible associations of the androgen levels in follicular fluid and blood plasma in patients with diminished ovarian reserve (POR) in IVF programs. Cross-sectional study with a parallel group design, conducted in 2019–2021, enrolled 300 patients with infertility, aged 18–42 years, applying for assisted reproduction involving IVF/intracytoplasmic sperm injection and embryo transfer. The androgen profiles of blood plasma and follicular fluid were determined by liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Androgen concentrations in blood plasma and follicular fluid, particularly those of dehydroepiandrosterone (DHEA-S), androstenedione and total testosterone, significantly correlated. The results implicate androgen levels in blood plasma and follicular fluid as early markers of POR in patients with infertility.

Keywords: androgens, androgen deficiency, testosterone, dehydroepiandrosterone, androstenedione, reproductive age, infertility, assisted reproductive technologies, LC-MS/MS, follicular fluid

Author contribution: Gavisova AA, Dolgushina NV — study concept and design; Gavisova AA, Shevtsova MA — analysis, manuscript writing; Kindysheva SV — laboratory tests, statistical analysis; Starodubtseva NL, Nazarenko TA, Frankevich VE, Dolgushina NV — manuscript editing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the ethical review board at the Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology (protocol № 140 of 15 December 2014). The informed consent was submitted by all study participants.

✉ **Correspondence should be addressed:** Alla A. Gavisova
Akademika Oparina, 4, Moscow, 117997; gaviiala@ya.ru

Received: 29.07.2022 **Accepted:** 13.08.2022 **Published online:** 19.08.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.041

Сниженный овариальный резерв (СОР) у пациенток с бесплодием сопряжен с низкой эффективностью лечения в программах вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ). Снижение уровня андрогенов с возрастом и при СОР дает основание предполагать, что андрогены играют неотъемлемую роль в регуляции процессов фолликулогенеза и ухудшении результатов программ ВРТ.

Несмотря на большое разнообразие андрогенов, высокой биологической активностью обладают только тестостерон и дигидротестостерон. Оценка взаимосвязи между концентрациями андрогенов в плазме крови и

фолликулярной жидкости является одним из актуальных направлений, особенно в аспекте изучения женщин с бесплодием и СОР. На сегодняшний день не ясно, какой из представителей андрогенов и в какой биологической среде является наиболее диагностически ценным маркером снижения овариального резерва.

Роль фолликулярной жидкости как биологической среды, которая окружает ооцит, участвует в метаболических процессах в фолликуле и в которой происходят важные для последующей фертилизации этапы оогенеза, ученые исследуют как при гиперандрогенных,

так и при гипоандрогенных состояниях [1–3]. Показано, что эндокринная среда, в частности концентрация антимюллерова гормона (АМГ) в фолликулярной жидкости ассоциирована с количеством ооцитов и имплантационным потенциалом эмбрионов [4–6]. Данные биологические феномены зависят от сложных динамических взаимоотношений между развивающейся яйцеклеткой и ее микроокружением — фолликулярной жидкостью и структурными компонентами фолликула.

С возрастом отмечается снижение концентрации АМГ в сыворотке крови и тестостерона, что ассоциировано с уменьшением числа фолликулов у женщин позднего репродуктивного возраста [7]. В нескольких исследованиях изучали гормональный профиль в сыворотке крови и в фолликулярной жидкости в зависимости от возраста пациентки при ЭКО в естественном цикле. Было обнаружено снижение уровня тестостерона в фолликулярной жидкости у женщин в возрасте 40–45 лет, по сравнению с женщинами в возрасте 20–25 лет [8].

Результаты фундаментальных исследований, в которых проводили анализ концентрации тестостерона в сыворотке крови и в фолликулярной жидкости, достаточно противоречивы. Так, при снижении уровня тестостерона в сыворотке крови с возрастом не обнаружено снижения концентрации в фолликулярной жидкости у пациенток с бедным ответом в естественном цикле [9]. В связи с этим необходимы исследования по оценке эндокринной связи между кровью и фолликулярной жидкостью, чтобы дать ответ, насколько концентрация андрогенов в крови взаимосвязана с процессами фолликулогенеза и оценить роль андрогенов у пациенток с бесплодием и сниженным овариальным резервом.

В ранее опубликованных исследованиях измерения стероидов в фолликулярной жидкости проводили с использованием иммунохимических методов, недостатком которых является перекрестная реакция со структурно родственными соединениями [10–12]. Методы жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии более специфичны [13] и позволяют проводить точное количественное определение одновременно нескольких стероидов [14, 15].

Цель исследования — проанализировать связь уровня андрогенов в плазме крови и фолликулярной жидкости у пациенток с бесплодием и сниженным овариальным резервом яичников в программах ВРТ.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Было проведено одномоментное исследование в параллельных группах. В нем участвовали 300 пациенток репродуктивного возраста (18–42 года) с бесплодием и сниженным овариальным резервом, обратившиеся в ФБГУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова» Минздрава России с 2019 по 2021 год для проведения программы ВРТ. Все пациентки сдавали кровь на 2–3-й день менструального цикла. Критерии включения в исследование: возраст участниц — 18–42 лет; бесплодие в анамнезе; наличие подписанного добровольного информированного согласия. Критерии исключения: хирургическая менопауза; гистерэктомия; надпочечниковая недостаточность; гормонпродуцирующие опухоли; ожирение ($ИМТ \geq 30 \text{ кг/м}^2$); дефицит массы тела ($ИМТ \leq 18 \text{ кг/м}^2$); ВИЧ-инфекция и другие иммунодефицитные состояния; иммуновоспалительные ревматические заболевания, иммуномодулирующая терапия, прием глюкокортикостероидов, онкологические заболевания.

Пациентки были разделены на группы в зависимости от возраста: группу 1 составили 149 пациенток раннего репродуктивного возраста (18–35 лет), группу 2 — 151 пациентка позднего репродуктивного возраста (35–42 лет).

В соответствии с критериями POSEIDON (The Patient-Oriented Strategies Encompassing Individualized Oocyte Number) пациентки каждой возрастной группы разделены на подгруппы в зависимости от овариального резерва: подгруппа 0 — нормальный овариальный резерв (76 пациенток раннего и 69 пациенток позднего репродуктивного возраста; $АМГ \geq 1,2 \text{ нг/мл}$), количество антральных фолликулов (КАФ) ≥ 5), подгруппа 1 — сниженный овариальный резерв (73 пациентки раннего и 82 пациентки позднего репродуктивного возраста; $АМГ < 1,2 \text{ нг/мл}$, $КАФ < 5$). Блок-схема представлена на рис. 1.

При сборе анамнеза учитывали следующие факторы: возраст пациентки; возраст наступления менопаузы у матери женщины; указание на проведенные операции или травмы внутренних половых органов в анамнезе; перенесенные воспалительные и инфекционные заболевания половых органов; наличие эндометриоза / спаечной болезни; число попыток экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) в анамнезе; акушерский анамнез.

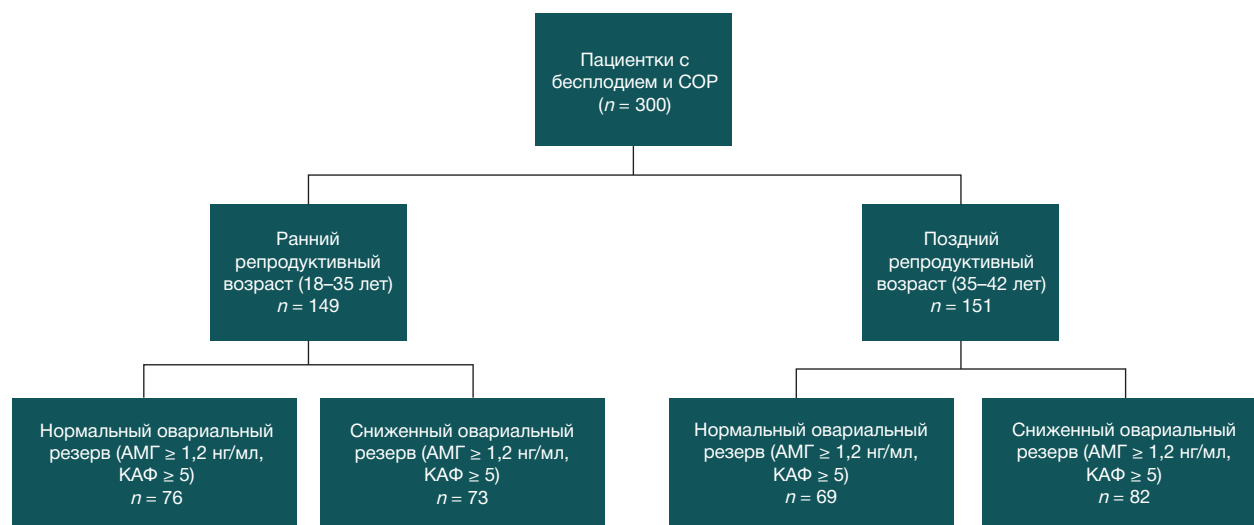


Рис. 1. Блок-схема исследования

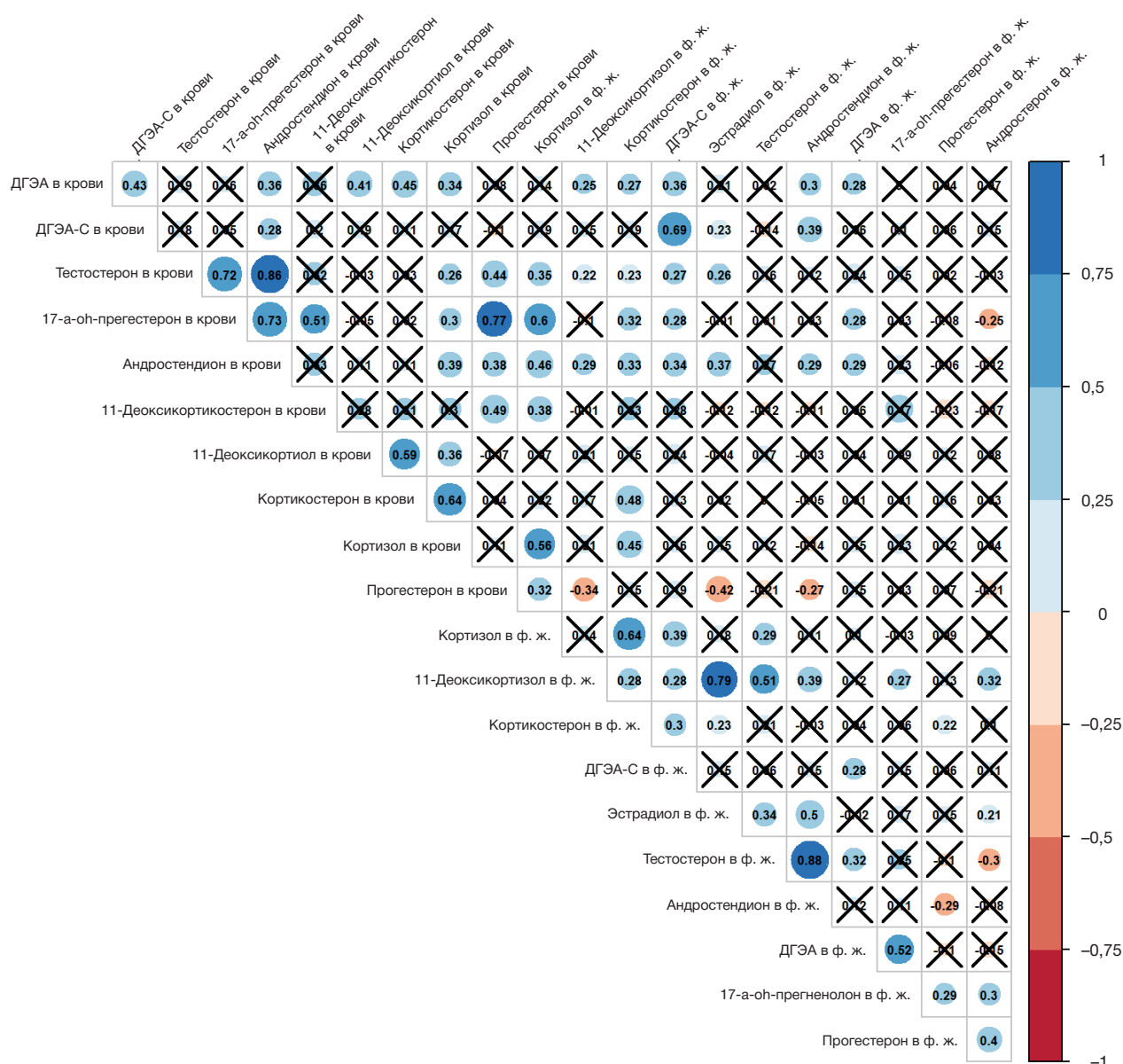


Рис. 2. Коэффициенты корреляции между уровнями концентрации гормонов в плазме крови и в фолликулярной жидкости (ф. ж.) методом ВЭЖХ – МС/МС у женщин с бесплодием и СОР

Для мониторинга фолликулогенеза выполняли УЗИ. Программу ЭКО проводили стандартно, в протоколе с антагонистами гонадотропин-рилизинг гормона (ГнРГ), в качестве индукторов фолликулогенеза использовали мочевые, рекомбинантные гонадотропины или их комбинацию. Ежедневную дозу гонадотропинов определяли индивидуально, в зависимости от состояния овариального резерва, но она была не менее 225 Ме в сутки; в качестве триггера овуляции использовали хорионический гонадотропин. Во время трансвагинальной пункции яичников производили забор крови и фолликулярной жидкости из первого фолликула.

Для измерений концентрации гормонов (тестостерона, дегидроэпиандростерона (ДГЭА), дегидроэпиандростерон-сульфата (ДГЭА-С), андростендиона, дигидротестостерона, прогестерона, гидроксипрогестерона, прегненолона, гидроксипрегненолона, кортизола) методом tandemной масс-спектрометрии использовали набор аналитических стандартов стероидных гормонов Steroid Hormones in Serum LC-MS/MS Analysis Kit (JASEM; Турция). Набор содержал четыре калибровочных смеси 16 стероидных гормонов в

лиофилизированном виде, двух уровней контроля качества в лиофилизированном виде и смеси внутренних стандартов (IS). Подвижные фазы А (дистиллированная вода milliQ с 0,01% муравьиной кислоты) и В (ацетонитрил с 0,01% муравьиной кислоты), а также МТБЕ ($\geq 99,5\%$, HPLC grade, Fisher Chemical; США), MeOH (99,9%, HPLC Basic, Scharlau; Испания), ацетонитрил (99,9%, HPLC Gradient grade, Fisher Chemical; США) и муравьиная кислота (98%, Sigma-Aldrich; США), которые использовали для подготовки фазы и пробоподготовки образцов. Разделение гормонов осуществляли на колонке Poroshel 120 EC-C18 (Agilent; США) длиной 100 мм, внутренним диаметром 2,1 мм и размером зерна сорбента 2,7 мкм.

В процессе пробоподготовки смесь 460 мкл образца и 25 мкл IS дважды экстрагировали 1 мл МТБЭ с последующим снятием 800 мкл супернатанта в отдельный эппендорф и его высушиванием в токе азота при 50 °C. Полученный сухой остаток разбавляли 100 мкл 50%-го MeOH и переносили в виал со вставкой для ВЭЖХ-МС/МС-измерений.

Для анализа образцов использовали систему ВЭЖХ-МС/МС, которая включает в себя квадрупольный масс-

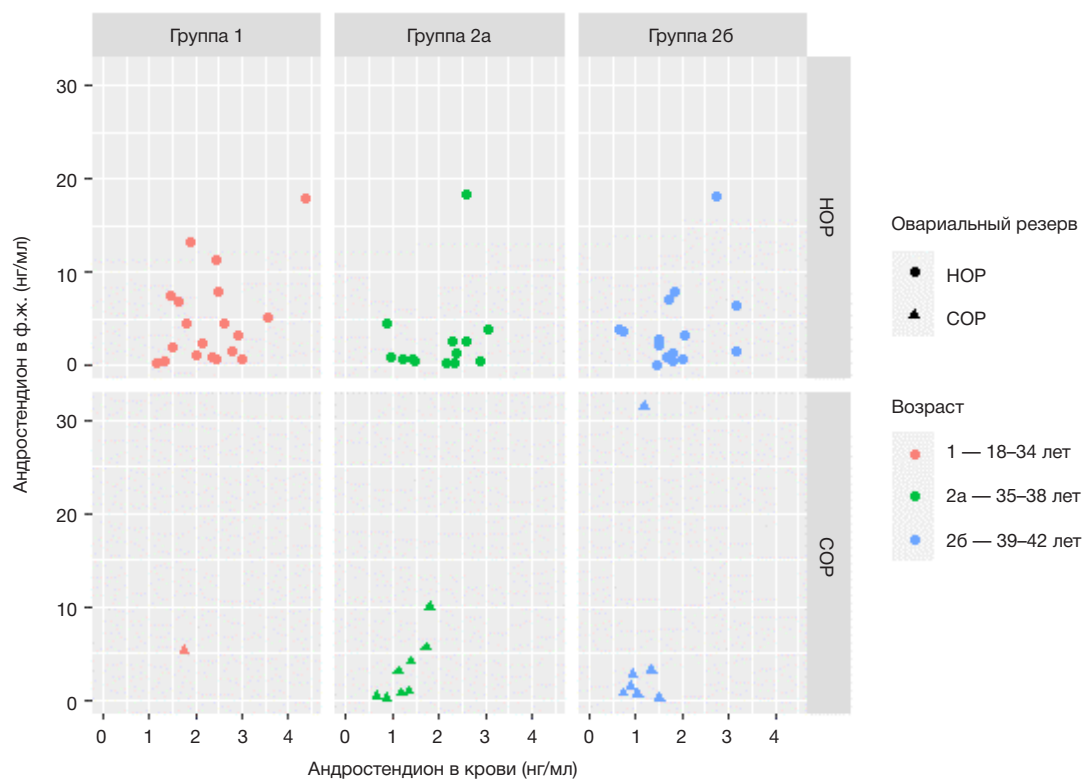


Рис. 3. Зависимость концентрации андростендиона в фолликулярной жидкости (ф. ж.) от его концентрации в плазме крови для разных возрастных групп. Младше 35 лет (группа 1), от 35 до 38 лет включительно (группа 2а), старше 39 лет (группа 2б) со снижением овариального резерва (подгруппа 1) и нормальным овариальным резервом (подгруппа 0)

спектрометрический детектор AB Sciex QTRAP 5500 с источником электрораспылительной ионизации и жидкостной хроматограф Agilent 1260 Infinity (Agilent; США) с насосом высокого давления, термостатом колонок и автосемплером на 108 виал.

Статистический анализ

Для статистического анализа использовали скрипты, написанные на языке программирования R [16].

Для определения возможной связи между переменными использовали корреляционный анализ. Оценку статистической значимости осуществляли с помощью непараметрического критерия по Спирмену. В случае отсутствия части численных значений у исследуемых переменных коэффициент корреляции вычисляли по всем имеющимся полным парам значений измерений для каждой исследуемой пары отдельно. Для оценки статистической значимости корреляции параметров опросника использовали непараметрический критерий Кендела. При описании количественных данных использовали медианы (Me) и квантили Q_1 и Q_3 в формате Me (Q_1 ; Q_3).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Средний возраст исследуемых женщин составил $37,3 \pm 2,4$ года. При оценке индивидуальной массы тела (ИМТ) была выявлена тенденция к увеличению этого показателя с возрастом: у пациенток позднего репродуктивного возраста со сниженным овариальным резервом он достигал $24,6 \pm 5,4$, хотя статистически значимой разницы не выявлено.

Репродуктивный анамнез характеризовался в среднем наличием более трех безуспешных программ

ЭКО и криопротоколов, завершившихся негативным результатом на этапе гормональной верификации наличия беременности. Длительность бесплодия статистически значимо увеличивалась в зависимости от возраста и овариального резерва и составила $7,2 \pm 2,4$ лет в группе пациенток старшего репродуктивного возраста с СОР, среди которых 65,4% имели первичное бесплодие. Число проводимых циклов ВРТ в анамнезе тоже было статистически значимо больше в группе пациенток старшего репродуктивного возраста с СОР и составило $2,3 \pm 0,9$.

Был проведен сравнительный анализ данных о концентрациях гормонов, полученных в плазме крови и в фолликулярной жидкости в день аспирации ооцитов. Значения концентрации большинства анализируемых гормонов (ДГЭА-С, тестостерон общий, 17-ОП, андростендион) в плазме крови и в фолликулярной жидкости коррелировали между собой (рис. 2). Выявлена корреляция между уровнями андростендиона в крови и в фолликулярной жидкости (коэффициент корреляции — 0,29), умеренная корреляция между ДГЭА-С в крови и в фолликулярной жидкости (коэффициент корреляции — 0,69). Сильная корреляция между концентрациями андростендиона и тестостерона в крови (коэффициент корреляции — 0,86) и андростендиона и тестостерона в фолликулярной жидкости (коэффициент корреляции 0,88) патогенетически может объяснить снижение овариального резерва и связь уровня андрогенов и фолликулогенеза.

Был проведен сравнительный анализ концентраций андростендиона и ДГЭА-С в крови и в фолликулярной жидкости у пациенток разных возрастных групп в зависимости от овариального резерва. С целью детального анализа зависимости концентраций андрогенов (маркеров снижения овариального резерва), ДГЭА-С и андростендиона в крови и в фолликулярной жидкости в

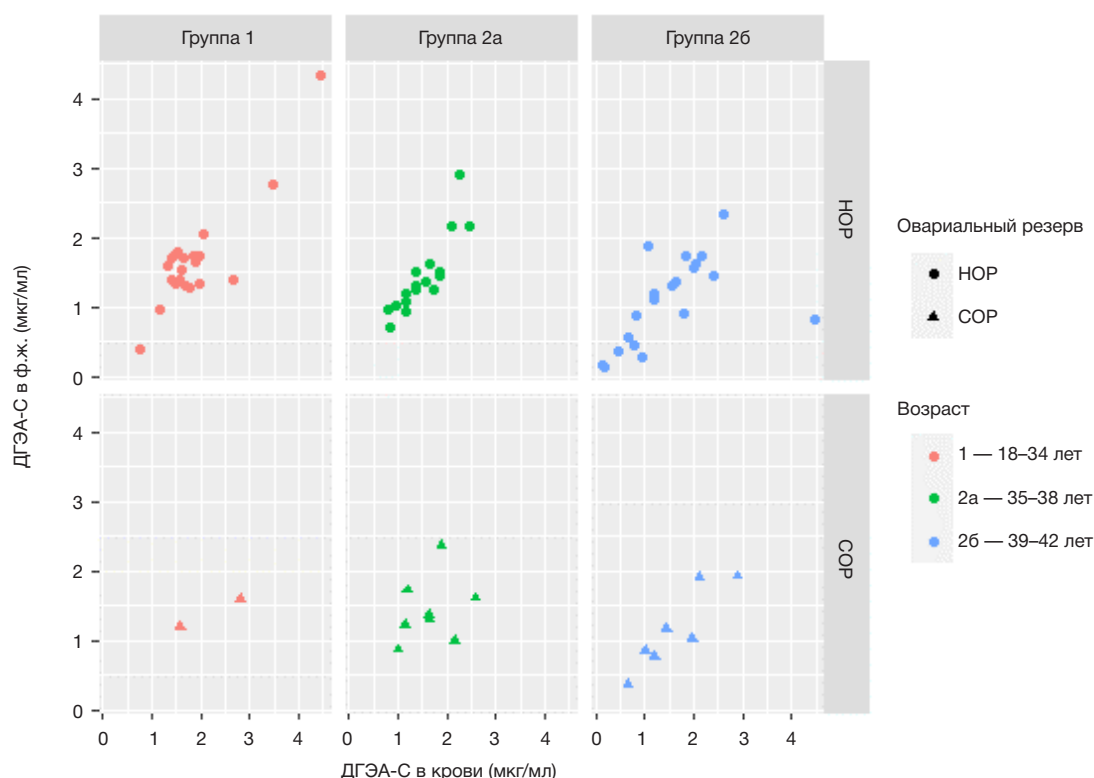


Рис. 4. Зависимость концентрации ДГЭА-С в фолликулярной жидкости (ф. ж.) от его концентрации в плазме крови для разных возрастных групп. Младше 35 лет (группа 1), от 35 до 38 лет включительно (группа 2.1), старше 39 лет (группа 2.2) со снижением овариального резерва (подгруппа 1) и нормальным овариальным резервом (подгруппа 0)

зависимости от возраста, пациентки группы 2 (от 35–42 лет) были разделены на подгруппы 35–38 лет (подгруппа 2а) и 39–42 лет (подгруппа 2б).

На рис. 3 по данным сравнительного анализа концентраций андростендиона в крови и в фолликулярной жидкости выявлено снижение уровня андростендиона в обеих биологических средах по мере снижения овариального резерва.

На рис. 4 по данным сравнительного анализа концентраций ДГЭА-С в крови и в фолликулярной жидкости отмечено также снижение его уровня в обеих биологических средах по мере снижения овариального резерва.

Даже без стратификации по группам в зависимости от возраста и снижения овариального резерва можно увидеть прямую линейную зависимость для ДГЭА-С (рис. 5), что свидетельствует о его ценности, как предшественника андростендиона и маркера андрогенной активности вне зависимости от возраста.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Данное исследование было направлено на определение уровня андрогенов как предшественников эстрогенов с помощью чувствительного и специфического метода ВЭЖХ-МС/МС [9, 15] в образцах плазмы крови и в фолликулярной жидкости в программе ЭКО. Снижение овариального резерва было сопряжено с овариальной гипоандрогенией, при которой избирательно снижаются уровни андрогенов, синтезируемых тека-клетками. Это можно расценивать как ранние проявления возрастного андрогенного дефицита. Выявлена также взаимосвязь между концентрациями андрогенов в крови и в фолликулярной жидкости как среды для роста и развития ооцитов. Отмечено снижение концентрации андростендиона как предшественника

тестостерона, а также ДГЭА-С как предшественника андростендиона и маркера андрогенной активности в фолликулярной жидкости; более того, концентрация каждого из изучаемых гормонов прямо пропорционально коррелировала с таковой в плазме крови.

Существующие маркеры овариального резерва, в частности АМГ и КАФ, не всегда полноценно отражают истинную клиническую картину и показатели эмбриологического этапа у женщин раннего и позднего репродуктивного возраста и сильно различаются как по количеству зрелых ооцитов, так и по количеству зигот и частоты бластуляции, равно как различаются и уровни андрогенов, и концентрация [15, 17, 18], и активность их рецепторов. Фолликулярная жидкость обеспечивает микроокружение, в котором развивается и созревает ооцит, и доступна во время пункции фолликулов в программе ЭКО для биохимических измерений, позволяющих получить представление о процессах оогенеза.

По некоторым данным, концентрация тестостерона в зрелых фолликулах выше у женщин с синдромом поликистозных яичников (СПКЯ), по сравнению с его концентрацией у пациенток с нормальным овариальным резервом, а овариальная стимуляция у пациенток с СПКЯ незначительно увеличивает уровень тестостерона в фолликулярной жидкости, по сравнению с естественными циклами [10].

В проспективном когортном исследовании при определении концентраций эндогенных стероидов методом жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии в фолликулярной жидкости был определен ведущий андроген в фолликулярной жидкости, которым оказался андростендион [9].

В одном из исследований при изучении концентраций эстрадиола, прогестерона, 17-гидроксипрогестерона, андростендиона и тестостерона в перивульторный

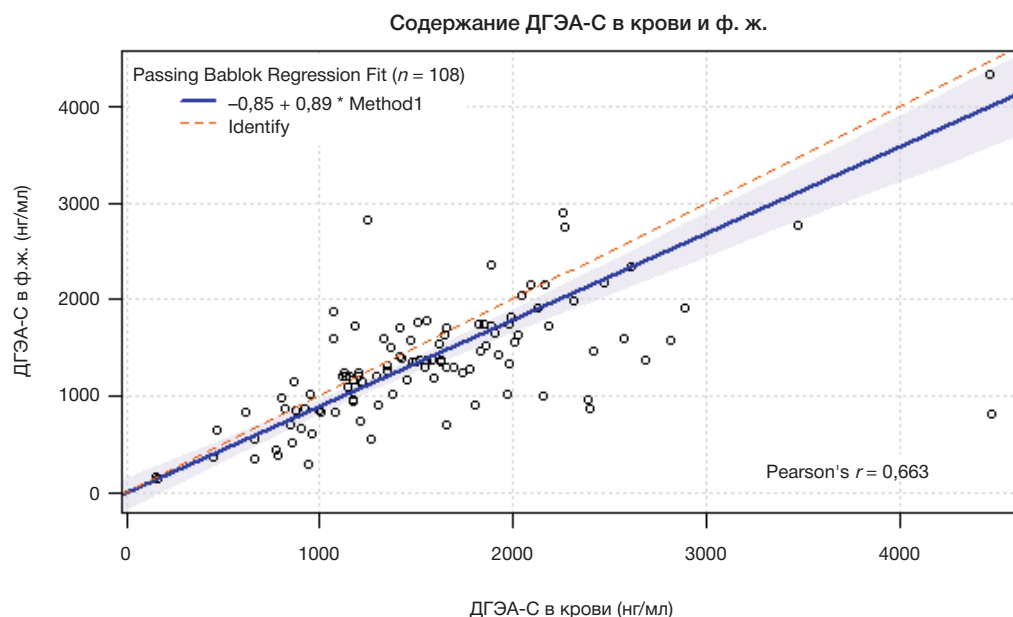


Рис. 5. Корреляционный и линейный регрессионный анализ по всем точкам данных между концентрациями ДГЭА-С в крови и в фолликулярной жидкости (ф. ж.)

период забор фолликулярной жидкости осуществляли в день введения триггера овуляции, а затем через 12, 17, 32 и 36 ч от введения триггера [17]. Было выявлено, что для концентрации эстрадиола и тестостерона была характерна динамика в периовуляторный период, а концентрация андростендиона не подвергалась существенным изменениям на протяжении всего периовуляторного периода, ни в плазме крови, ни в фолликулярной жидкости. Тем не менее, аналогично нашим данным, корреляционный анализ показал положительную взаимосвязь уровней андростендиона и тестостерона в фолликулярной жидкости. С учетом того, что концентрации общего тестостерона в крови у женщин низкие и есть трудности их измерения, корреляция уровней андростендиона и общего тестостерона как в плазме, так и в фолликулярной жидкости, позволяет говорить об андростендионе, как о возможном маркере снижения овариального резерва у женщин репродуктивного возраста с бесплодием.

Выявлено также статистически значимое увеличение концентрации андрогенов в фолликулярной жидкости при использовании менотропинов для стимуляции функции яичников [18]; однако в нашем исследовании связь с препаратами для стимуляции не обнаружена.

Авторы другой работы исследовали концентрации андрогенов в сыворотке крови и в фолликулярной жидкости у пациенток с бедным ответом, которые были разделены на четыре группы согласно критериям POSEIDON. Они продемонстрировали сопоставимые уровни тестостерона, андростендиона, ДГЭА-С в крови между пациентками с нормальным резервом и первой группой по POSEIDON. Однако выявлено значимое снижение уровней гормонов между контролем и группой 3 по POSEIDON в сыворотке крови. Концентрация ДГЭА-С в фолликулярной жидкости была статистически значимо ниже в группе 3 по POSEIDON, в то время как концентрации тестостерона,

андростендиона, эстрадиола и ГСПС в фолликулярной жидкости оказались сопоставимы между группами. Уровень сывороточного тестостерона был статистически значимо ниже в группах пациенток старше 35 лет, независимо от показателей овариального резерва (группа 2 и 4 по POSEIDON). Авторы выявили прямую корреляцию между сывороточной и фолликулярной концентрацией ДГЭА-С [19]. Полученные нами данные тоже подтверждают высокую корреляцию уровней гормонов в фолликулярной жидкости и в плазме крови.

ВЫВОДЫ

Представленные данные свидетельствуют, что при сниженном овариальном резерве отмечается избирательное снижение уровней андрогенов в фолликулярной жидкости, что подтверждает гипотезу о вкладе андрогенов и роли их дефицита. Полученные данные о корреляции между общим тестостероном и андростендионом не только в плазме крови, но и в фолликулярной жидкости свидетельствуют о диагностической ценности данных андрогенов как ранних маркеров формирования андрогенного дефицита у женщин с бесплодием при сниженном овариальном резерве. Использование ВЭЖХ-МС/МС для определения уровня андрогенов у женщин с бесплодием в программе ЭКО может быть предиктивно значимо для выявления взаимосвязи между концентрациями тестостерона и андростендиона в плазме крови и фолликулярной жидкости как микроокружения ооцитов. Дискуссия о возможности прогнозирования исходов ВРТ по уровню андрогенов требует проведения более углубленных исследований вследствие растущей клинической необходимости повышения эффективности программ ВРТ и прогнозирования их исходов на этапе анализа состава фолликулярной жидкости.

Литература

- Hill MJ, Levens ED, Levy G, Ryan ME, Csokmay JM, DeCherme AH, et al. The use of recombinant luteinizing hormone in patients undergoing assisted reproductive techniques with advanced reproductive age: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2012; 97 (5): 1108–14.
- Luo S, Li S, Li X, Qin L, Jin S. Effect of pretreatment with transdermal testosterone on poor ovarian responders undergoing IVF/ICSI: a meta-analysis. *Exp Ther Med*. 2014; 8 (1): 187–94.
- Von Wolff M, Kollmann Z, Flück CE, Stute P, Marti U, Weiss B, et al. Gonadotrophin stimulation for in vitro fertilization significantly alters the hormone milieu in follicular fluid: a comparative study between natural cycle IVF and conventional IVF. *Hum Reprod*. 2014; 29 (5): 1049–57.
- Fanchin R, Mendez Lozano DH, Frydman N, Gougeon A, di Clemente N, Frydman R, et al. Anti-Müllerian hormone concentrations in the follicular fluid of the preovulatory follicle are predictive of the implantation potential of the ensuing embryo obtained by in vitro fertilization. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007; 92 (5): 1796–802.
- Pabuccu R, Kaya C, Çağlar GS, Oztas E, Satiroglu H. Follicular-fluid anti-Müllerian hormone concentrations are predictive of assisted reproduction outcome in PCOS patients. *Reprod Biomed Online*. 2009; 19 (5): 631–37.
- Takahashi C, Fujito A, Kazuka M, Sugiyama R, Ito H, Isaka K. Anti-Müllerian hormone substance from follicular fluid is positively associated with success in oocyte fertilization during in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2008; 89 (3): 586–91.
- Van Disseldorp J, Faddy MJ, Themmen AP, de Jong FH, Peeters PH, van der Schouw YT. Relationship of serum antimüllerian hormone concentration to age at menopause. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008; 93 (6): 2129–34.
- Barbieri RL, Sluss PM, Powers RD, McShane PM, Vitonis A, Ginsburg E, et al. Association of body mass index, age, and cigarette smoking with serum testosterone levels in cycling women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2005; 83 (2): 302–8.
- Kushnir M, Naessen T, Wanggren K, Hreinsson J, Rockwood AL, Meikle AW. Exploratory study of the association of steroid profiles in stimulated ovarian follicular fluid with outcomes of IVF treatment. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2016; 162: 126–33.
- Kim J, Lee J, Chang H, Jee BC, Chang SS, Kim SH. Anti-Müllerian hormone levels in the follicular fluid of the preovulatory follicle: a predictor for oocyte fertilization and quality of embryo. *J Korean Med Sci*. 2014; 29 (9): 1266–70.
- Wen X, Li D, Tozer A, Suzanna MD, Ray KI. Estradiol, progesterone, testosterone profiles in human follicular fluid and cultured granulosa cells from luteinized pre-ovulatory follicles. *Reprod Biol Endocrinol*. 2010; 8: 117.
- Handelsman D. Mass spectrometry, immunoassay and valid steroid measurements in reproductive medicine and science. *Hum Reprod*. 2017; 32 (6): 1–4.
- Yang Z, Zhou W, Zhou C, Zhou Y, Liu X, Ding G, et al. Steroid metabolome profiling of follicular fluid in normo- and hyperandrogenic women with polycystic ovary syndrome. *J Steroid Biochem Mol Biol Epub*. 2021; 206: 105806.
- Bongrani A, Ploton I, Mellouk N, Ramé C, Guerif F, Froment P, et al. High androgen concentrations in follicular fluid of polycystic ovary syndrome women. *Reprod Biol Endocrinol*. 2022; 20 (1): 88.
- Harwood DT, Handelsman DJ. Development and validation of a sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay to simultaneously measure androgens and estrogens in serum without derivatization. *Clin Chim Acta*. 2009; 409 (1–2): 78–84.
- Jonas Schäler, Georg Thaller, Dirk Hinrichs. A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2018. R Studio: Integrated Development for R. R Studio, Inc., Boston MA.
- Poulsen LC, Englund ALM, Andersen AS, Bøtkjær JA, Mamsen LS, Damdimopoulou P, et al. Follicular hormone dynamics during the midcycle surge of gonadotropins in women undergoing fertility treatment. *Mol Hum Reprod*. 2020; 26 (4): 256–68.
- Бурдули А. Г., Кициловская Н. А., Сухова Ю. В., Ведикина И. А., Иванец Т. Ю. и др. Фолликулярная жидкость и исходы программ вспомогательных репродуктивных технологий (обзор литературы). *Гинекология*. 2019; 21 (6): 36–40.
- Fuentes A, Sequeira K, Tapia-Pizarro A, Muñoz A, Salinas A, Céspedes P, et al. Androgens profile in blood serum and follicular fluid of women with poor ovarian response during controlled ovarian stimulation reveals differences amongst POSEIDON stratification groups: a pilot study. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019; 10: 458.

References

- Hill MJ, Levens ED, Levy G, Ryan ME, Csokmay JM, DeCherme AH, et al. The use of recombinant luteinizing hormone in patients undergoing assisted reproductive techniques with advanced reproductive age: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2012; 97 (5): 1108–14.
- Luo S, Li S, Li X, Qin L, Jin S. Effect of pretreatment with transdermal testosterone on poor ovarian responders undergoing IVF/ICSI: a meta-analysis. *Exp Ther Med*. 2014; 8 (1): 187–94.
- Von Wolff M, Kollmann Z, Flück CE, Stute P, Marti U, Weiss B, et al. Gonadotrophin stimulation for in vitro fertilization significantly alters the hormone milieu in follicular fluid: a comparative study between natural cycle IVF and conventional IVF. *Hum Reprod*. 2014; 29 (5): 1049–57.
- Fanchin R, Mendez Lozano DH, Frydman N, Gougeon A, di Clemente N, Frydman R, et al. Anti-Müllerian hormone concentrations in the follicular fluid of the preovulatory follicle are predictive of the implantation potential of the ensuing embryo obtained by in vitro fertilization. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007; 92 (5): 1796–802.
- Pabuccu R, Kaya C, Çağlar GS, Oztas E, Satiroglu H. Follicular-fluid anti-Müllerian hormone concentrations are predictive of assisted reproduction outcome in PCOS patients. *Reprod Biomed Online*. 2009; 19 (5): 631–37.
- Takahashi C, Fujito A, Kazuka M, Sugiyama R, Ito H, Isaka K. Anti-Müllerian hormone substance from follicular fluid is positively associated with success in oocyte fertilization during in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2008; 89 (3): 586–91.
- Van Disseldorp J, Faddy MJ, Themmen AP, de Jong FH, Peeters PH, van der Schouw YT. Relationship of serum antimüllerian hormone concentration to age at menopause. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008; 93 (6): 2129–34.
- Barbieri RL, Sluss PM, Powers RD, McShane PM, Vitonis A, Ginsburg E, et al. Association of body mass index, age, and cigarette smoking with serum testosterone levels in cycling women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2005; 83 (2): 302–8.
- Kushnir M, Naessen T, Wanggren K, Hreinsson J, Rockwood AL, Meikle AW. Exploratory study of the association of steroid profiles in stimulated ovarian follicular fluid with outcomes of IVF treatment. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2016; 162: 126–33.
- Kim J, Lee J, Chang H, Jee BC, Chang SS, Kim SH. Anti-Müllerian hormone levels in the follicular fluid of the preovulatory follicle: a predictor for oocyte fertilization and quality of embryo. *J Korean Med Sci*. 2014; 29 (9): 1266–70.
- Wen X, Li D, Tozer A, Suzanna MD, Ray KI. Estradiol, progesterone, testosterone profiles in human follicular fluid and cultured granulosa cells from luteinized pre-ovulatory follicles. *Reprod Biol Endocrinol*. 2010; 8: 117.
- Handelsman D. Mass spectrometry, immunoassay and valid steroid measurements in reproductive medicine and science.

- Hum Reprod. 2017; 32 (6): 1–4.
13. Yang Z, Zhou W, Zhou C, Zhou Y, Liu X, Ding G, et al. Steroid metabolome profiling of follicular fluid in normo- and hyperandrogenic women with polycystic ovary syndrome. *J Steroid Biochem Mol Biol Epub*. 2021; 206: 105806.
 14. Bongrani A, Ploton I, Mellouk N, Ramé C, Guerif F, Froment P, et al. High androgen concentrations in follicular fluid of polycystic ovary syndrome women. *Reprod Biol Endocrinol*. 2022; 20 (1): 88.
 15. Harwood DT, Handelsman DJ. Development and validation of a sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay to simultaneously measure androgens and estrogens in serum without derivatization. *Clin Chim Acta*. 2009; 409 (1–2): 78–84.
 16. Jonas Schäler, Georg Thaller, Dirk Hinrichs. A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2018. R Studio: Integrated Development for R. R Studio, Inc., Boston MA.
 17. Poulsen LC, Englund ALM, Andersen AS, Bøtkjær JA, Mamsen LS, Damdimopoulou P, et al. Follicular hormone dynamics during the midcycle surge of gonadotropins in women undergoing fertility treatment. *Mol Hum Reprod*. 2020; 26 (4): 256–68.
 18. Burduli AG, Kitsilovskaya NA, Sukhova YV, Vedikhina IA, Ivanets TY, Chagovets VV, Starodubtseva NL, Frankevich VE. Follicular fluid and assisted reproductive technology programs outcomes (literature review). *Gynecology*. 2019; 21 (6): 36–40. Russian.
 19. Fuentes A, Sequeira K, Tapia-Pizarro A, Muñoz A, Salinas A, Céspedes P. et al. Androgens profile in blood serum and follicular fluid of women with poor ovarian response during controlled ovarian stimulation reveals differences amongst POSEIDON stratification groups: a pilot study. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019; 10: 458.

ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ СТЭНФОРДСКОЙ НЕЙРОМОДУЛИРУЮЩЕЙ ТЕРАПИИ У ПАЦИЕНТОВ С ТЕРАПЕВТИЧЕСКИ РЕЗИСТЕНТНОЙ ДЕПРЕССИЕЙ

А. Г. Пойдашева¹✉, И. С. Бакулин¹, Д. О. Синицын¹, А. Х. Забиров¹, Н. А. Супонева¹, Н. В. Маслеников², Э. Э. Цукарзи², С. Н. Мосолов^{2,3}, М. А. Пирадов¹

¹ Научный центр неврологии, Москва, Россия

² Московский научно-исследовательский институт психиатрии, Москва, Россия

³ Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования, Москва, Россия

Стэнфордская нейромодулирующая терапия (SNT) — новейший протокол магнитной стимуляции, разработанный для лечения терапевтически резистентных депрессий (ТРД). Целью исследования было оценить возможности реализации SNT в клинической практике, определить безопасность и эффективность протокола в независимом центре у пациентов с ТРД в рамках рекуррентного депрессивного и биполярного расстройств. В исследование вошли шесть пациентов (из них три женщины в возрасте 21–66 лет) с ТРД в рамках рекуррентной депрессии и биполярного расстройства 1-го и 2-го типов. В течение пяти дней пациентам проводили стимуляцию интермиттирующими тета-вспышками по протоколу SNT: ежедневно по 10 тройных блоков стимуляции с интервалом 1 ч между соседними блоками и выбором зоны стимуляции с максимальной негативной функциональной коннективностью с субгенуальной поясной корой в пределах левой дорсолатеральной префронтальной коры. Для клинической оценки эффекта применяли шкалу Монтгомери–Асберг, длительность периода наблюдения составила три месяца. У пяти пациентов сразу после окончания SNT отмечено снижение выраженности депрессии до уровня ремиссии (≤ 10 баллов по MADRS). Через три месяца два пациента оставались в ремиссии, у троих состояние соответствовало легкому депрессивному эпизоду, одна пациентка вышла из исследования из-за логистических трудностей. Серьезных нежелательных явлений не зарегистрировано. Полученные результаты подтверждают безопасность и потенциально высокую эффективность SNT в том числе при биполярных расстройствах 1-го и 2-го типов.

Ключевые слова: терапевтически резистентная депрессия, биполярное аффективное расстройство, транскраниальная магнитная стимуляция, стимуляция тета-вспышками

Вклад авторов: А. Г. Пойдашева, И. С. Бакулин, С. Н. Мосолов — планирование и дизайн исследования; А. Г. Пойдашева, А. Х. Забиров — анализ литературы; А. Г. Пойдашева, Д. О. Синицын, Н. В. Маслеников, Э. Э. Цукарзи — сбор и анализ данных; все авторы — интерпретация данных; А. Г. Пойдашева, Д. О. Синицын — написание статьи; все авторы — редактирование статьи.

Соблюдение этических стандартов: протокол исследования одобрен этическим комитетом ФГБНУ НЦН (протокол № 11-1/21 от 22 декабря 2021 г.); исследование проведено в соответствии с принципами Хельсинкской декларации; все пациенты подписывали добровольное информированное согласие.

✉ Для корреспонденции: Александра Георгиевна Пойдашева
Волоколамское шоссе, д. 80, Москва, 125367, Россия; poydasheva@neurology.ru

Статья получена: 08.08.2022 Статья принята к печати: 22.08.2022 Опубликовано онлайн: 30.08.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.044

EXPERIENCE OF STANFORD NEUROMODULATION THERAPY IN PATIENTS WITH TREATMENT-RESISTANT DEPRESSION

Poydasheva AG¹✉, Bakulin IS¹, Sinitsyn DO¹, Zabirowa AH¹, Suponeva NA¹, Maslenikov NV², Tsukarzi EE², Mosolov SN^{2,3}, Piradov MA¹

¹ Research Center of Neurology, Moscow, Russia

² Moscow Research Institute of Psychiatry, Moscow, Russia

³ Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russia

Stanford neuromodulation therapy (SNT) is the state-of-the-art magnetic stimulation protocol that has been developed for management of treatment-resistant depression (TRD). The study was aimed to assess the possibility of SNT implementation in clinical practice and to define the protocol safety and efficacy in patients with TRD being an episode of the recurrent depressive disorder or bipolar disorder at the independent center. The study involved six patients (among them three women aged 21–66) with TRD associated with recurrent depression and type 1 or 2 bipolar disorder. The patients received intermittent theta-burst stimulation in accordance with the SNT protocol for five days: applying 10 triple blocks of stimulation daily at intervals of 1 hr between the blocks to the selected stimulation site showing maximum negative functional connectivity with subgenual cingulate cortex within the left dorsolateral prefrontal cortex. The Montgomery–Asberg Depression Rating Scale (MADRS) was used for clinical assessment of the effects, the follow-up period was three months. The improvement of depressive symptoms to the levels characteristic of remission immediately after the SNT completion was observed in five patients (MADRS score ≤ 10). After three months, two patients still had remission, the condition of three patients met the criteria of mild depressive episode, and one female patient withdrew from the study due to logistical difficulties. No serious adverse events were reported. The findings confirm safety and potentially high efficacy of SNT, including in patients with type 1 and 2 bipolar disorders.

Keywords: treatment-resistant depression, bipolar disorder, transcranial magnetic stimulation, theta-burst stimulation

Author contribution: Poydasheva AG, Bakulin IS, Mosolov SN — study planning and design; Poydasheva AG, Zabirowa AH — literature review; Poydasheva AG, Sinitsyn DO, Maslenikov NV, Tsukarzi EE — data acquisition and analysis; all authors — data interpretation; Poydasheva AG, Sinitsyn DO — manuscript writing; all authors — manuscript editing.

Compliance with ethical standards: the research protocol was approved by the Ethics Committee at the Research Center of Neurology (protocol № 11-1/21 of 22 December 2021); the study was conducted in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki; the informed consent was submitted by all study participants.

✉ Correspondence should be addressed: Alexandra G. Poydasheva
Volokolamskoe shosse, 80, Moscow, 125367, Russia; poydasheva@neurology.ru

Received: 08.08.2022 Accepted: 22.08.2022 Published online: 30.08.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.044

Высокая частота терапевтически резистентных депрессивных эпизодов обуславливает актуальность разработки новых эффективных немедикаментозных подходов к терапии этих состояний [1–3]. К наиболее широко используемым в клинической практике немедикаментозным методам можно отнести технологии неинвазивной стимуляции мозга, в частности, ритмическую транскраниальную магнитную стимуляцию (рТМС). Согласно имеющимся представлениям, долговременный эффект стимуляции обусловлен индукцией процессов, схожих с процессами синаптической пластичности, и опосредован NMDA- и AMPA-рецепторами [4]. Помимо модуляции процессов синаптической пластичности продолжается обсуждение влияния рТМС на процессы нейрогенеза, секрецию нейромедиаторов, а также «физических» эффектов электромагнитного поля [4, 5].

В крупных контролируемых двойных слепых исследованиях получены убедительные данные об эффективности применения методов неинвазивной стимуляции в терапии депрессии [6, 7]. Согласно имеющимся рекомендациям, применение рТМС и стимуляции тета-вспышками (TBS) в терапии резистентного депрессивного эпизода имеет высокие уровни доказанности эффекта [8]. Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (Food and Drug Administration, FDA, США) одобрено два протокола для лечения терапевтически резистентной депрессии: в 2008 г. — высокочастотная (частота 10 Гц) рТМС дорсолатеральной префронтальной коры (ДЛПФК) левого полушария, а в 2018 г. — стимуляция интермиттирующими тета-вспышками (iTBS) левой ДЛПФК [9]. Однако, несмотря на достаточно веские доказательства в пользу применения описанных выше протоколов стимуляции при терапевтически резистентных депрессиях, основным фактором, сдерживающим еще более широкое их использование, является выраженная вариабельность эффекта. Так, по данным двух наиболее крупных метаанализов, доля пациентов, отвечающих на рТМС-терапию, составляет 25–55%, а достичь клинической ремиссии удастся лишь в 16–30% случаев [10, 11]. Увеличение эффективности стимуляции и снижение вариабельности эффекта — важнейшие задачи, стоящие перед исследователями.

В настоящее время ведется разработка нескольких подходов к увеличению эффективности. К наиболее перспективным и изученным в контексте резистентной депрессии можно отнести персонализированный выбор мишени для стимуляции и применение так называемых «акселерированных» протоколов. В 2012 г. предложен персонализированный подход к выбору мишени для стимуляции на основе анализа функциональной коннективности (ФК) между субгенуальной поясной корой (Сг) и ДЛПФК левого полушария [12]. Он основан на данных о наличии нарушений функциональной коннективности Сг у пациентов с депрессией [13], а также о зависимости клинического эффекта рТМС от ФК между стимулируемой областью и Сг [12]. Однако при сравнении эффективности рТМС с использованием персонализированного и стандартного подходов были получены неоднородные результаты [14, 15]. «Акселерированными» называют протоколы, включающие проведение нескольких сессий стимуляций в течение одного дня для достижения общего числа стимулов, значительно превышающего стандартные значения. Согласно результатам недавно проведенного метаанализа, включавшего исследования с применением

«акселерированных» протоколов, их применение оказывает умеренный эффект, но по-прежнему не решает проблему его высокой вариабельности [16].

Наконец, в 2019 г. был разработан протокол, получивший название «станфордская нейромодулирующая терапия» (от англ. *stanford neuromodulation therapy*, SNT), сочетающий в себе и выбор мишени на основе анализа ФК, и крайне высокое число стимулов (18 000 стимулов в сутки по сравнению с 3000 и 600 стимулами в сутки в стандартных протоколах рТМС и TBS соответственно) [17]. Согласно пилотным данным открытого исследования 90% пациентов, которым проводили SNT, достигли ремиссии (определенной как значение балла по шкале Монтгомери–Асберг менее 11), что значительно превышает эффективность использовавшихся ранее протоколов [17]. В 2022 г. той же группой были опубликованы результаты контролируемого двойного слепого исследования, показавшего значимый эффект SNT по сравнению с имитацией стимуляции и подтвердившего безопасность и очень высокую долю пациентов, ответивших на терапию (респондеров), а также пациентов, достигших ремиссии [18].

Однако до настоящего времени полученные результаты не были подтверждены другими исследовательскими группами. Кроме того, в оригинальное исследование включали пациентов с диагностированным большим депрессивным расстройством (major depression, согласно классификации DSM-IV), тогда как исследования безопасности и эффективности применения SNT у пациентов с депрессивным эпизодом в рамках биполярного аффективного расстройства не проводилось.

Таким образом, цель настоящего пилотного исследования — оценка возможности реализации протокола SNT в клинической практике и получение данных о безопасности и эффективности протокола в независимом центре, в том числе в новой когорте пациентов с биполярным расстройством.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Пациенты

Набор пациентов осуществляли на базе Московского научно-исследовательского института психиатрии, филиала ФГБУ «НМИЦ ПН им. В. П. Сербского» Минздрава России, а проведение SNT — на базе института нейрореабилитации и восстановительной неврологии ФГБНУ «Научный центр неврологии» в 2022 г.

Критерии включения пациентов: текущий фармакорезистентный эпизод легкой и средней степени тяжести в рамках рекуррентного депрессивного или биполярного расстройства; возраст 18–70 лет; отсутствие противопоказаний к проведению MPT и TMC; отсутствие тяжелых соматических заболеваний, требующих поддержания жизненно важных функций аппаратными методами; отсутствие грубых когнитивных нарушений и других заболеваний нервной системы. Наличие фармакорезистентности определяли по отсутствию клинического эффекта применения двух или более курсов антидепрессантов разных фармакологических групп в адекватных дозировках и длительностью не менее четырех недель [19, 20]. Часть пациентов продолжали получать препараты из групп антидепрессантов, антипсихотиков и анксиолитиков в неизменной дозировке. Критерии исключения из исследования: развитие при проведении стимуляции тета-вспышками серьезных

нежелательных явлений (СНЯ), таких как эпилептический приступ, синкопальное состояние, головная боль высокой интенсивности; развитие после включения в исследование тяжелой соматической, психической патологии, заболеваний нервной системы, установка электрокардиостимулятора, внутрисердечных катетеров или проведение операций на головном мозге, требующих оставления металлических предметов в полости черепа, наступление беременности, отказ от продолжения участия в исследовании.

Всем пациентам до начала стимуляции на аппаратах Нейрон-Спектр-4/П, («Нейрософт»; Россия) и actiCHamp Plus 64 (BP-100-2511) (Brain Products GmbH; Германия) проводили скрининговую электроэнцефалографию для оценки наличия эпилептиформной активности. Пациентов с выявленной эпилептиформной активностью исключали из исследования.

Определение мишени для стимуляции

С целью определения локализации мишени для стимуляции всем пациентам на магнитно-резонансном томографе Magnetom Prisma SIEMENS (Германия) с величиной магнитной индукции 3Тл проводили нейровизуализационное обследование, включавшее две последовательности: режим T1-взвешенных изображений с изотропным вокселем с возможностью реконструкции изображений в любых проекциях (MPR) для получения структурных данных (TR — 2200 мс, толщина среза — 1 мм, число срезов — 176) и режим «мультипланарное градиентное эхо» (ep2d_bold_moco: TR — 2200 мс, 36 срезов в аксиальной проекции) для анализа функциональной коннективности. Мишень для стимуляции определяли индивидуально для каждого пациента на основе анализа функциональной МРТ покоя. Препроцессинг нейровизуализационных данных проводили с помощью ПО CONN functional connectivity toolbox (Functional Connectivity SPM Toolbox 2017, McGovern Institute for Brain Research, Massachusetts Institute of Technology, Кембридж, США; <http://www.nitrc.org/projects/conn>), версия 17f, и SPM12 (Functional Imaging Laboratory, Wellcome Department of Imaging Neuroscience, Institute of Neurology, Лондон, Великобритания; <http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm/software/>), он состоял из стандартных шагов, описанных ранее [15]. После проведения препроцессинга в том же пакете ПО индивидуально для каждого пациента была сгенерирована карта, содержащая значения ФК между субгенуальной поясной корой и всеми областями мозга, и выбрана зона в анатомических пределах левой ДЛПФК с наиболее отрицательным ее значением (рис. 1). В качестве seed-региона использовалась сфера диаметром 10 мм, сгенерированная вокруг субгенуальной части поясной извилины (Cr) (точки с координатами MNI (6,16,-10).

Протокол стимуляции

Стимуляцию интермиттирующими тета-вспышками проводили с помощью стимулятора MagPro X100 MagOption (Tonica Elektronik A/S; Дания) с восьмеркообразной катушкой и жидкостным охлаждением в сочетании с навигационной системой Localite TMS Navigator (Localite GmbH; Германия) и роботизированным манипулятором катушки Axilum Robotics TMS-Cobot (Axilum Robotics; Франция). Интенсивность стимуляции составляла 120% моторного порога покоя, определенного при

регистрации ВМО с первой межкостной мышцы правой кисти согласно алгоритму Россини–Ротвелла. Стимуляцию проводили в течение пяти последовательных будних дней. Каждый день пациенты проходили 10 сессий стимуляции интермиттирующими тета-вспышками с часовым интервалом между двумя соседними сессиями. Одна сессия включала в себя три стандартных блока тета-вспышек по 600 стимулов. Таким образом, суммарная доза стимулов за день составляла 18 000, а за курс — 90 000 стимулов (рис. 2).

Клиническая оценка

Для определения клинического эффекта SNT была использована шкала оценки депрессии Монтгомери–Асберг, или MADRS (от англ. *Montgomery–Asberg depression rating scale*) [21]. Оценивали в пяти временных точках: до начала стимуляции, сразу после окончания стимуляции, через 1, 2 и 3 месяца после окончания стимуляции. Клинически значимым ответом считали снижение балла по MADRS более чем на 50% от исходного, при оценке 10 баллов и ниже состояние рассматривали как наступление ремиссии [22]. Кроме того, до начала исследования у всех пациентов проводили стадирование терапевтически резистентной депрессии с применением модели Модсли, (от англ. *Maudsley staging method, MSM*) [23]. Для оценки безопасности, переносимости и нежелательных явлений (НЯ) использовали оригинальные опросники: отдельно анализировали НЯ, регистрируемые непосредственно во время стимуляции, и НЯ, регистрируемые в течение 24 ч после стимуляции.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование были включены шесть пациентов (три женщины, трое мужчин) в возрасте 21–66 лет с текущим фармакорезистентным депрессивным эпизодом легкой или умеренной степени выраженности в рамках рекуррентного депрессивного расстройства (два пациента), биполярного расстройства 1-го типа (два пациента) и 2-го типа (два пациента) (табл.). Длительность заболевания у пациентов составила от 5 до 47 лет, а число перенесенных эпизодов — не менее четырех.

У пяти из шести пациентов сразу после окончания курса терапии (6-й день) было отмечено снижение выраженности симптомов депрессии до уровня ремиссии (оценка по шкале MADRS — 10 баллов и ниже) (рис. 3). У оставшегося шестого пациента сразу после завершения курса балл по MADRS не изменился. Одна из пациенток досрочно завершила участие в исследовании на этапе оценки сразу после завершения стимуляции. Таким образом, для изучения устойчивости эффекта были доступны данные пяти пациентов. При оценке через месяц один пациент продолжал оставаться в ремиссии (диагноз F31.8), тогда как у четверых оставшихся баллы соответствовали легкому депрессивному эпизоду (два пациента с диагнозом F33.1 и две пациентки с диагнозом F31.3). Через два месяца состояние трех пациентов соответствовало критериям ремиссии (диагнозы F31.8, F33.1, F31.3), двух пациентов — критериям легкого депрессивного эпизода (диагнозы F33.1, F31.3). При этом оценка баллов по сравнению с исходными значениями у четырех пациентов из пяти соответствовала критериям клинически значимого ответа на терапию (снижение более чем на 50% от исходного уровня). Через три месяца два пациента продолжали

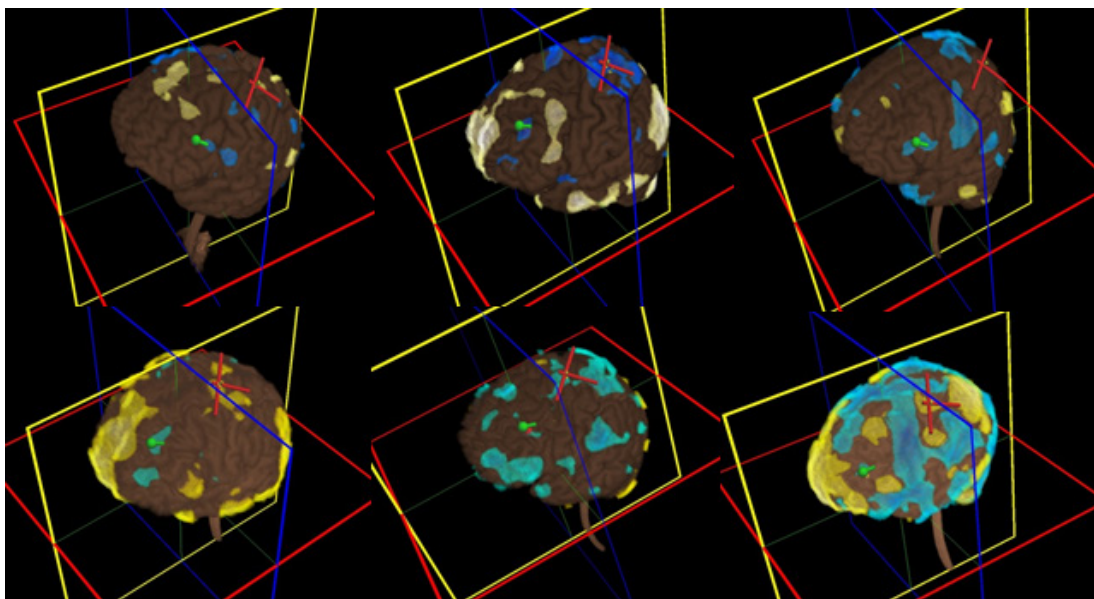


Рис. 1. Визуализация данных анализа функциональной связности и выбора мишени у пациентов. Цветом показаны значения ФК между субгенуальной частью поясной извилины и визуализированными областями коры. Мишень указана зеленой меткой

оставаться в состоянии ремиссии (диагнозы F33.1, F31.3), у трех пациентов состояние соответствовало легкому депрессивному эпизоду (диагнозы F31.8, F33.1, F31.3). Критериям клинически значимого ответа на терапию по сравнению с исходным баллом соответствовали два пациента. Интересно отметить, что у единственного пациента, у которого не было ответа на терапию сразу после окончания стимуляции (диагноз F33.1), отсроченного эффекта также отмечено не было.

Серьезных НЯ в виде эпилептических приступов, синкопальных состояний, головных болей высокой интенсивности зарегистрировано не было. Два пациента после окончания первого блока из 10 стимуляций (вечером первого дня) отметили легкую головную боль (интенсивность до 3 баллов по числовой шкале боли), самопроизвольно разрешившаяся в течение 2–3 ч без дополнительного приема препаратов. В другие дни головные боли этих пациентов не беспокоили. Кроме того, одна пациентка после первого блока стимуляций пожаловалась на нарастание тревоги, изменение настроения и нарушения сна. При этом к утру следующего

дня ажитация регрессировала. В дальнейшем изменение настроения и бессонница эту пациентку не беспокоили. Инверсии фазы ни у одного из пациентов с биполярным расстройством зафиксировано не было.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ходе проведенного пилотного исследования были продемонстрированы безопасность и хорошая переносимость нового протокола SNT у пациентов с депрессивным эпизодом в рамках не только рекуррентной депрессии, но и биполярного расстройства, включение пациентов с которым отличает наше исследование от других работ. Выявленные НЯ носили легкий характер, не требовали назначения дополнительной терапии и не приводили к отказу от проведения процедур и участия в исследовании.

В результате исследования показано, что непосредственно после окончания стимуляции доля пациентов, выраженность депрессивной симптоматики у которых соответствовала критериям ремиссии, составила 83%.

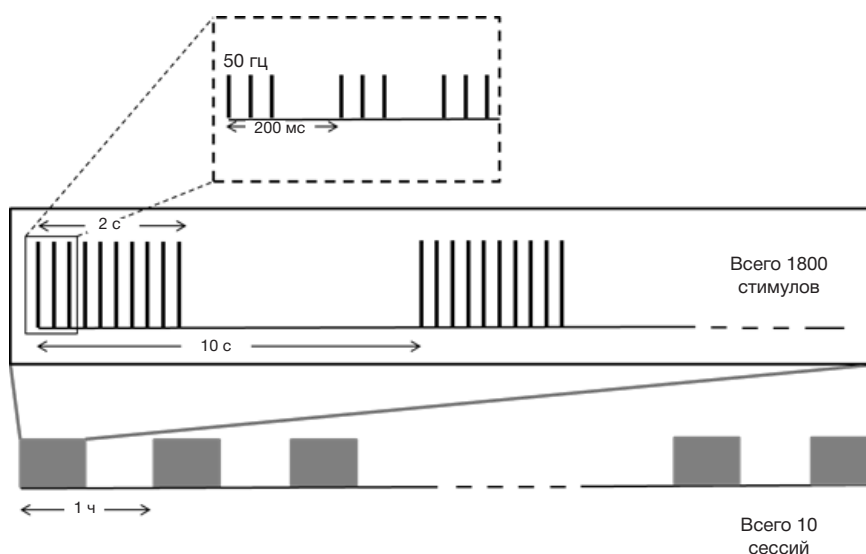


Рис. 2. Схема протокола Стэнфордской нейромодулирующей терапии (SNT)

Таблица. Клинико-демографические данные пациентов, включенных в исследование

№	Пол	Возраст	Диагноз (код МКБ-10)	Балл по MADRS	Оценка резистентности по MSM	Длительность заболевания, лет	Число эпизодов
1	м	36	F33.1	19	10	13	8
2	м	29	F33.1	14	7	13	7
3	м	66	F31.8	19	10	47	10
4	ж	31	F31.3	19	6	15	10
5	ж	21	F31.8	21	7	5	4
6	ж	58	F31.3	27	6	34	12

Примечание: MADRS (Montgomery-Åsberg Depression Rating Scale) — шкала оценки депрессии Монтгомери–Асберг; MSM (Maudsley Staging Method) — модель Модсли для стадирования терапевтически резистентной депрессии

При оценке длительности эффекта получены разнородные данные: у 75% пациентов, имевших клинически значимый эффект SNT сразу после окончания стимуляции, эффект сохранялся в течение двух месяцев, а у трети пациентов — не менее трех месяцев. Полученные пилотные данные позволяют предполагать, что эффективность SNT у пациентов с рекуррентной депрессией высокая и значительно превышает эффективность одобренных FDA протоколов, что согласуется с данными разработчиков SNT. Кроме того, показано уменьшение выраженности симптомов депрессии у пациентов с биполярным расстройством, что актуализирует проведение двойных слепых контролируемых исследований эффективности SNT и у этой когорты пациентов.

К настоящему моменту нет понимания, является ли более высокая эффективность SNT по сравнению с одобренными FDA протоколами следствием более прецизионного выбора мишени, большого числа стимулов за сессию или за курс, сочетания этих факторов или иного механизма. Несмотря на то что рядом исследователей показана эффективность использования алгоритма выбора мишени на основании анализа ФК с Сг по сравнению с имитацией стимуляции [24], при сравнении применения данного алгоритма со стандартным выбором мишени, увеличения эффективности стимуляции показано не было [15]. Таким образом, изолированный вклад прецизионного выбора мишени в увеличение эффективности представляется маловероятным. Говоря об «акселерированных» протоколах важно отметить неоднородность полученных к настоящему моменту результатов: в ранних работах были показаны обнадеживающие результаты [25], однако в дальнейшем в крупных исследованиях с применением как высокочастотной rTMS, так и стимуляции тета-вспышками были получены негативные результаты [26, 27]. Хотя

непосредственно сравнивать протоколы, использованные в двух последних исследованиях, с SNT не совсем корректно, так как суммарное число стимулов в SNT в несколько раз больше, чем в исследованных «акселерированных» протоколах. Кроме того, значимую роль в размере эффекта может играть не только общее число стимулов, но и, например, длительность одного блока стимуляции или длительность межблокового временного интервала. Особенно актуальными эти вопросы представляются в свете активно развивающейся в последнее время концепции о метапластичности [28]. Согласно представлениям о метапластичности, предшествующая активность определяет порог для индукции, зависимой от активности пластичности, причем не только величины и продолжительности индуцированных нейропластических изменений, но и их направленности. Таким образом, в контексте SNT каждый предшествующий блок стимуляции может потенцировать изменения, индуцированные последующим блоком посредством механизма аддитивной метапластичности. Важно, что изложенные потенциальные механизмы увеличения эффективности SNT по сравнению с одобренными протоколами являются гипотетическими и требуют проверки в исследованиях с контролем каждого из упомянутых факторов по отдельности.

В ходе клинической апробации протокола SNT нами был выявлен целый ряд факторов, ограничивающих внедрение метода в широкую практику. Во-первых, к таким факторам можно отнести высокую трудоемкость протокола: каждому пациенту ежедневно в течение пяти дней необходимо провести 10 сессий стимуляции с интервалом 1 ч, что требует специальной организации как режима труда персонала, так и режима пациента. Общая занятость персонала и пациентов составляет 11 ч ежедневно. Кроме того, пропускная способность транскраниального

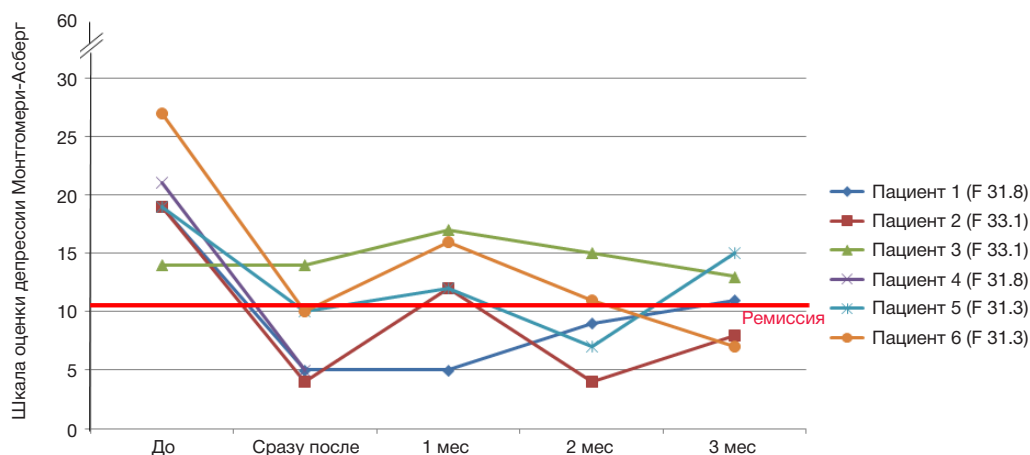


Рис. 3. Динамика выраженности депрессивной симптоматики: индивидуальные данные

магнитного стимулятора при применении SNT значительно ограничена: одновременно на одном аппарате терапию можно проводить только троим пациентам. Для выполнения протокола необходимы высокотехнологичное оборудование (система для ТМС с нейронавигацией и высокопольный МР-томограф), а также сотрудники, обеспечивающие анализ нейровизуализационных данных и работу с навигационной системой. Эти факторы значительно снижают доступность технологии в целом. Перспективным представляется исследование эффективности протоколов, частично соответствующих SNT (например, с соблюдением кратности и числа стимуляций, но без прецизионного выбора мишени), применение которых при их эффективности значительно увеличило бы доступность методики.

К ограничениям настоящего исследования следует отнести малое число включенных пациентов, отсутствие контроля, а также среднюю тяжесть имевшихся у них аффективных расстройств. Вместе с тем, важно отметить, что целью проведенного исследования была оценка возможности внедрения протокола SNT в клиническую практику, а также независимое подтверждение его

эффективности и безопасности, в том числе в новой когорте пациентов с биполярным расстройством. Полученные результаты демонстрируют реализуемость SNT и перспективность дальнейшего изучения эффективности и безопасности этого метода, в том числе проведения слепых контролируемых исследований на более широких когортах пациентов.

ВЫВОДЫ

По результатам клинической апробации, проведенной на небольшой выборке пациентов, показано, что Стэнфордская нейромодулирующая терапия — безопасный и потенциально высокоэффективный метод лечения терапевтически резистентных депрессий, сопряженный, однако, с высокими трудозатратами. Проведение дальнейших исследований, которые потенциально позволят расширить спектр показаний для SNT и повысить доступность метода для практики, представляется перспективным направлением в области неинвазивной стимуляции мозга у пациентов с резистентными к психофармакотерапии аффективными расстройствами.

Литература

- Максимова Н. М., Русяев В. Ю., Узбеков М. Г. Нейробиологические механизмы развития резистентных депрессий. Социальная и клиническая психиатрия. 2021; 31 (4): 71–79.
- Voineskos D, Daskalakis ZJ, Blumberger DM. Management of Treatment-Resistant Depression: Challenges and Strategies. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2020; 16: 221–34.
- Мосолов С. Н., Алфимов П. В., Костюкова Е. Г. Современные методы преодоления терапевтической резистентности при рекуррентной депрессии. В книге: С. Н. Мосолов, редактор. Биологические методы терапии психических расстройств. М., 2012; с. 438–73.
- Miron JP, Jodoin VD, Lépérance P, Blumberger DM. Repetitive transcranial magnetic stimulation for major depressive disorder: basic principles and future directions. *Ther Adv Psychopharmacol*. 2021; 11: 20451253211042696.
- Chervyakov AV, Chernyavsky AY, Sinitsyn DO, Piradov MA. Possible Mechanisms Underlying the Therapeutic Effects of Transcranial Magnetic Stimulation. *Front Hum Neurosci*. 2015; 9: 303.
- O'Reardon JP, Solvason HB, Janicak PG, Sampson S, Isenberg KE, Nahas Z, et al. Efficacy and safety of transcranial magnetic stimulation in the acute treatment of major depression: a multisite randomized controlled trial. *Biol Psychiatry*. 2007; 62 (11): 1208–16.
- Blumberger DM, Vila-Rodriguez F, Thorpe KE, Feffer K, Noda Y, Giacobbe P, et al. Effectiveness of theta burst versus high-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation in patients with depression (THREE-D): a randomised non-inferiority trial. *Lancet*. 2018; 391 (10131): 1683–92.
- Lefaucheur JP, Aleman A, Baeken C, Benninger DH, Brunelin J, Di Lazzaro V, et al. Evidence-based guidelines on the therapeutic use of repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS): An update (2014–2018). *Clin Neurophysiol*. 2020; 131 (2): 474–528.
- Boes AD, Kelly MS, Trapp NT, Stern AP, Press DZ, Pascual-Leone A. Noninvasive Brain Stimulation: Challenges and Opportunities for a New Clinical Specialty. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 2018; 30 (3): 173–79.
- Berlim MT, van den Eynde F, Tovar-Perdomo S, Daskalakis ZJ. Response, remission and drop-out rates following high-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) for treating major depression: a systematic review and meta-analysis of randomized, double-blind and sham-controlled trials. *Psychol Med*. 2014; 44 (2): 225–39.
- Sehatzadeh S, Daskalakis ZJ, Yap B, Tu HA, Palimaka S, Bowen JM, et al. Unilateral and bilateral repetitive transcranial magnetic stimulation for treatment-resistant depression: a meta-analysis of randomized controlled trials over 2 decades. *J Psychiatry Neurosci*. 2019; 44 (3): 151–63.
- Fox MD, Buckner RL, White MP, Greicius MD, Pascual-Leone A. Efficacy of transcranial magnetic stimulation targets for depression is related to intrinsic functional connectivity with the subgenual cingulate. *Biol Psychiatry*. 2012; 72 (7): 595–603.
- Drevets WC, Price JL, Furey ML. Brain structural and functional abnormalities in mood disorders: implications for neurocircuitry models of depression. *Brain Struct Funct*. 2008; 213 (1–2): 93–118.
- Антонович Б. А., Майорова Л. А., Цукарзи Э. Э., Мосолов С. Н. Нейронные сети состояния покоя при депрессиях и перспективы применения персонифицированной ТМС. Современная терапия психических расстройств. 2019; 3: 2–11.
- Пойдашева А. Г., Синицын Д. О., Бакулин И. С., Супонев Н. А., Маслеников Н. В., Цукарзи Э. Э. и др. Определение мишени для транскраниальной магнитной стимуляции у пациентов с резистентным к фармакотерапии депрессивным эпизодом на основе индивидуальных параметров функциональной магнитно-резонансной томографии покоя (пилотное слепое контролируемое исследование. Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. 2019; 11 (4): 44–50.
- Sonmez AI, Camsari DD, Nandakumar AL, Voort JLV, Kung S, Lewis CP, et al. Accelerated TMS for Depression: A systematic review and meta-analysis. *Psychiatry Res*. 2019; 273: 770–81.
- Cole EJ, Stimpson KH, Bentzley BS, Gulser M, Cherian K, Tischler C, et al. Stanford Accelerated Intelligent Neuromodulation Therapy for Treatment-Resistant Depression. *Am J Psychiatry*. 2020; 177 (8): 716–26.
- Cole EJ, Phillips AL, Bentzley BS, Stimpson KH, Nejad R, Barnak F, et al. Stanford Neuromodulation Therapy (SNT): A Double-Blind Randomized Controlled Trial. *Am J Psychiatry*. 2022; 179 (2): 132–41.
- Ахалкин Р. В., Букреева Н. Д., Вазагаева Т. И., Костюкова Е. Г., Мазо Г. Э., Мосолов С. Н. Депрессивный эпизод, рекуррентное депрессивное расстройство. Клинические рекомендации. Взрослые. Электронное издание. 2021. Доступно по ссылке: https://cr.minzdrav.gov.ru/recomend/301_2.

20. Мосолов С. Н., Костюкова Е. Г., Ладыженский М. Я. Алгоритм биологической терапии острого эпизода рекуррентного депрессивного расстройства. Современная терапия психических расстройств. 2016; 3: 27–40.
21. Montgomery SA, Asberg M. A new depression scale designed to be sensitive to change. *Br J Psychiatry*. 1979; 134: 382–9.
22. Hawley CJ, Gale TM, Sivakumaran T; Hertfordshire Neuroscience Research group. Defining remission by cut off score on the MADRS: selecting the optimal value. *J Affect Disord*. 2002; 72 (2): 177–84.
23. Fekadu A, Wooderson SC, Markopoulou K, Cleare AJ. The Maudsley Staging Method for treatment-resistant depression: prediction of longer-term outcome and persistence of symptoms. *J Clin Psychiatry*. 2009; 70 (7): 952–7.
24. Siddiqi SH, Taylor SF, Cooke D, Pascual-Leone A, George MS, Fox MD. Distinct Symptom-Specific Treatment Targets for Circuit-Based Neuromodulation. *Am J Psychiatry*. 2020; 177 (5): 435–46.
25. Loo CK, Mitchell PB, McFarquhar TF, Malhi GS, Sachdev PS. A sham-controlled trial of the efficacy and safety of twice-daily rTMS in major depression. *Psychol Med*. 2007; 37 (3): 341–9.
26. Blumberger DM, Vila-Rodriguez F, Wang W, Knyahnytska Y, Butterfield M, Noda Y, et al. A randomized sham controlled comparison of once vs twice-daily intermittent theta burst stimulation in depression: A Canadian rTMS treatment and biomarker network in depression (CARTBIND) study. *Brain Stimul*. 2021; 14 (6): 1447–55.
27. Fitzgerald PB, Hoy KE, Elliot D, Susan McQueen RN, Wambeck LE, Daskalakis ZJ. Accelerated repetitive transcranial magnetic stimulation in the treatment of depression. *Neuropsychopharmacology*. 2018; 43 (7): 1565–72.
28. Abraham WC, Bear MF. Metaplasticity: the plasticity of synaptic plasticity. *Trends Neurosci*. 1996; 19 (4): 126–30.

References

1. Maksimova NM, Rusyaev VYu, Uzbekov MG. Neirobiologicheskije mexanizmy razvitiya rezistentnyx depressij. *Social'naya i klinicheskaya psixiatriya*. 2021; 31 (4): 71–79. Russian.
2. Voineskos D, Daskalakis ZJ, Blumberger DM. Management of Treatment-Resistant Depression: Challenges and Strategies. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2020; 16: 221–34.
3. Mosolov SN, Alfimov PV, Kostyukova EG. Sovremennye metody preodoleniya terapevticheskoy rezistentnosti pri rekurrentnoj depressii. V knige: S. N. Mosolov, redaktor. *Biologicheskie metody terapii psichicheskix rasstrojstv*. M., 2012; s. 438–73. Russian.
4. Miron JP, Jodoin VD, Lespérance P, Blumberger DM. Repetitive transcranial magnetic stimulation for major depressive disorder: basic principles and future directions. *Ther Adv Psychopharmacol*. 2021; 11: 20451253211042696.
5. Chervyakov AV, Chernyavsky AY, Sinitsyn DO, Piradov MA. Possible Mechanisms Underlying the Therapeutic Effects of Transcranial Magnetic Stimulation. *Front Hum Neurosci*. 2015; 9: 303.
6. O'Reardon JP, Solvason HB, Janicak PG, Sampson S, Isenberg KE, Nahas Z, et al. Efficacy and safety of transcranial magnetic stimulation in the acute treatment of major depression: a multisite randomized controlled trial. *Biol Psychiatry*. 2007; 62 (11): 1208–16.
7. Blumberger DM, Vila-Rodriguez F, Thorpe KE, Feffer K, Noda Y, Giacobbe P, et al. Effectiveness of theta burst versus high-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation in patients with depression (THREE-D): a randomised non-inferiority trial. *Lancet*. 2018; 391 (10131): 1683–92.
8. Lefaucheur JP, Aleman A, Baeken C, Benninger DH, Brunelin J, Di Lazzaro V, et al. Evidence-based guidelines on the therapeutic use of repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS): An update (2014–2018). *Clin Neurophysiol*. 2020; 131 (2): 474–528.
9. Boes AD, Kelly MS, Trapp NT, Stern AP, Press DZ, Pascual-Leone A. Noninvasive Brain Stimulation: Challenges and Opportunities for a New Clinical Specialty. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 2018; 30 (3): 173–79.
10. Berlim MT, van den Eynde F, Tovar-Perdomo S, Daskalakis ZJ. Response, remission and drop-out rates following high-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) for treating major depression: a systematic review and meta-analysis of randomized, double-blind and sham-controlled trials. *Psychol Med*. 2014; 44 (2): 225–39.
11. Sehatzadeh S, Daskalakis ZJ, Yap B, Tu HA, Palimaka S, Bowen JM, et al. Unilateral and bilateral repetitive transcranial magnetic stimulation for treatment-resistant depression: a meta-analysis of randomized controlled trials over 2 decades. *J Psychiatry Neurosci*. 2019; 44 (3): 151–63.
12. Fox MD, Buckner RL, White MP, Greicius MD, Pascual-Leone A. Efficacy of transcranial magnetic stimulation targets for depression is related to intrinsic functional connectivity with the subgenual cingulate. *Biol Psychiatry*. 2012; 72 (7): 595–603.
13. Drevets WC, Price JL, Furey ML. Brain structural and functional abnormalities in mood disorders: implications for neurocircuitry models of depression. *Brain Struct Funct*. 2008; 213 (1–2): 93–118.
14. Antonovich BA, Maforova LA, Cukarzi EhEh, Mosolov SN. Neifronnye seti sostoyaniya pokoya pri depressiyax i perspektivy primeneniya personificirovannoy TMS. *Sovremennaya terapiya psichicheskix rasstrojstv*. 2019; 3: 2–11. Russian.
15. Poydasheva AG, Sinitsyn DO, Bakulin IS, Suponeva NA, Maslenikov NV, Tsukarzi EE. i dr. Opredelenie misheni dlya transkraniyal'noj magnitnoj stimulyatsii u pacientov s rezistentnym k farmakoterapii depressivnym ehpidodom na osnove individual'nyx parametrov funkcional'noj magnitno-rezonansnoj tomografii pokoya (pilotnoe slepoe kontroliruemoe issledovanie. *Nevrologiya, nejropsixiatriya, psixosomatika*. 2019; 11 (4): 44–50. Russian.
16. Sonmez AI, Camsari DD, Nandakumar AL, Voort JLV, Kung S, Lewis CP, et al. Accelerated TMS for Depression: A systematic review and meta-analysis. *Psychiatry Res*. 2019; 273: 770–81.
17. Cole EJ, Stimpson KH, Bentzley BS, Gulser M, Cherian K, Tischler C, et al. Stanford Accelerated Intelligent Neuromodulation Therapy for Treatment-Resistant Depression. *Am J Psychiatry*. 2020; 177 (8): 716–26.
18. Cole EJ, Phillips AL, Bentzley BS, Stimpson KH, Nejad R, Barmak F, et al. Stanford Neuromodulation Therapy (SNT): A Double-Blind Randomized Controlled Trial. *Am J Psychiatry*. 2022; 179 (2): 132–41.
19. Axapkin RV, Bukreeva ND, Vazagaeva TI, Kostyukova EG, Mazo GEH, Mosolov SN. Depressivnyj ehpidod, rekurrentnoe depressivnoe rasstrojstvo. *Klinicheskie rekomendacii. Vzroslye. Ehlektronnoe izdanie*. 2021. Dostupno po ssylke: https://cr.minzdrav.gov.ru/recomend/301_2. Russian.
20. Mosolov SN, Kostyukova EG, Ladyzhenskij MYa. Algoritm biologicheskoy terapii ostroy epizoda rekurrentnogo depressivnogo rasstrojstva. *Sovremennaya terapiya psichicheskix rasstrojstv*. 2016; 3: 27–40. Russian.
21. Montgomery SA, Asberg M. A new depression scale designed to be sensitive to change. *Br J Psychiatry*. 1979; 134: 382–9.
22. Hawley CJ, Gale TM, Sivakumaran T; Hertfordshire Neuroscience Research group. Defining remission by cut off score on the MADRS: selecting the optimal value. *J Affect Disord*. 2002; 72 (2): 177–84.
23. Fekadu A, Wooderson SC, Markopoulou K, Cleare AJ. The Maudsley Staging Method for treatment-resistant depression: prediction of longer-term outcome and persistence of symptoms. *J Clin Psychiatry*. 2009; 70 (7): 952–7.
24. Siddiqi SH, Taylor SF, Cooke D, Pascual-Leone A, George MS, Fox MD. Distinct Symptom-Specific Treatment Targets for Circuit-Based Neuromodulation. *Am J Psychiatry*. 2020; 177 (5): 435–46.
25. Loo CK, Mitchell PB, McFarquhar TF, Malhi GS, Sachdev PS. A sham-controlled trial of the efficacy and safety of twice-daily rTMS in major depression. *Psychol Med*. 2007; 37 (3): 341–9.
26. Blumberger DM, Vila-Rodriguez F, Wang W, Knyahnytska Y, Butterfield M, Noda Y, et al. A randomized sham controlled comparison of once vs twice-daily intermittent theta burst stimulation in depression: A Canadian rTMS treatment and

- biomarker network in depression (CARTBIND) study. *Brain Stimul.* 2021; 14 (6): 1447–55.
27. Fitzgerald PB, Hoy KE, Elliot D, Susan McQueen RN, Wambeck LE, Daskalakis ZJ. Accelerated repetitive transcranial magnetic stimulation in the treatment of depression. *Neuropsychopharmacology.* 2018; 43 (7): 1565–72.
28. Abraham WC, Bear MF. Metaplasticity: the plasticity of synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* 1996; 19 (4): 126–30.

МАРКЕРЫ СИСТЕМНОГО ВОСПАЛЕНИЯ У КРЫС В МОДЕЛИ ДИЕТ-ИНДУЦИРОВАННОГО МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА

Ю. Г. Бирулина , О. В. Воронкова, В. В. Иванов, Е. Е. Буйко, М. М. Щербакова, Н. А. Чернышов, Е. А. Мотлохова

Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия

Системное воспаление лежит в основе патогенеза многих хронических неинфекционных заболеваний, в том числе таких, как сахарный диабет 2-го типа, ожирение, метаболический синдром (МС). Целью работы было оценить изменения параметров системной воспалительной реакции у крыс в модели диет-индуцированного МС. Исследование выполнено на 33 крысах-самцах Wistar, распределенных на контрольную и экспериментальную группы. Крысы контрольной группы ($n = 15$) находились на стандартной диете. Крысы экспериментальной группы ($n = 18$) в течение 12 недель находились на высокожировой и высокоуглеводной диете. Для оценки интенсивности воспалительного процесса на фоне метаболических нарушений определяли общее количество и морфологический состав лейкоцитов крови, концентрацию общего белка, С-реактивного белка, концентрацию цитокинов IL6, IL10, TNF α , инсулина и лептина. В образцах жировой ткани оценивали уровень продукции активных форм кислорода. В результате проведенного эксперимента у крыс с МС были зарегистрированы общие признаки воспаления: реактивный лейкоцитоз, гиперпротеинемия, повышение концентрации С-реактивного белка в 2,6 раза ($p = 0,001$), IL10 — в 3,7 раза ($p = 0,029$), TNF α — в 4,2 раза ($p = 0,035$). Выявленные изменения происходили на фоне повышения метаболической активности висцеральной жировой ткани, о чем свидетельствовали гиперлептинемия и высокая интенсивность процессов свободнорадикального окисления. Были обнаружены положительные корреляционные взаимосвязи между уровнями лептина и инсулина в крови ($r = 0,701$; $p = 0,001$), а также между сывороточной концентрацией лептина и IL10 ($r = 0,523$; $p = 0,012$). Таким образом, высокожировая и высокоуглеводная диета наряду с метаболическими нарушениями позволяет воспроизвести ранние признаки системного воспаления, характерные для МС и ожирения.

Ключевые слова: метаболический синдром, инсулинорезистентность, ожирение, воспаление, С-реактивный белок, IL10, TNF α

Финансирование: исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-25-20039, <https://rscf.ru/project/22-25-20039/> и средств Администрации Томской области.

Вклад авторов: Ю. Г. Бирулина, О. В. Воронкова — разработка концепции и дизайна, написание рукописи; В. В. Иванов, Е. Е. Буйко — моделирование метаболического синдрома на животных, выполнение анализа биохимических показателей крови; М. М. Щербакова — исследование цитокинов крови, Н. А. Чернышов — анализ литературы, исследование гемограммы; Е. А. Мотлохова — статистическая обработка результатов.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом СибГМУ (протокол № 8201 от 27 марта 2020 г.). Исследование выполнено с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/EEC) и Хельсинкской декларации.

 **Для корреспонденции:** Юлия Георгиевна Бирулина
ул. Московский тракт, д. 2, строение 7, г. Томск, 634050, Россия; birulina20@yandex.ru

Статья получена: 11.08.2022 **Статья принята к печати:** 25.08.2022 **Опубликована онлайн:** 30.08.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.043

SYSTEMIC INFLAMMATION MARKERS OF DIET-INDUCED METABOLIC SYNDROME IN RAT MODEL

Birulina JG , Voronkova OV, Ivanov VV, Buyko EE, Shcherbakova MM, Chernyshov NA, Motlokhova EA

Siberian State Medical University, Tomsk, Russia


Chronic systemic inflammation is essential in many chronic non-infectious diseases, including type 2 diabetes, obesity and metabolic syndrome (MS). This study aimed at characterization of systemic inflammatory reaction as a component of diet-induced MS in rat model. Thirty-three male Wistar rats were distributed into two groups designated 'control' ($n = 15$) and 'experimental (MS)' ($n = 18$). The groups were fed, respectively, regular and high-fat/high-carbohydrate diets for 12 weeks. The intensity of systemic inflammatory process against the background of metabolic impairments was assessed by total and differential counts of white blood cells and serum levels of total protein, C-reactive protein, cytokines (IL6, IL10 and TNF α), insulin and leptin. We also assessed the production of reactive oxygen species in adipose tissue samples. The experiment revealed signs of systemic inflammation in MS as compared to control, including reactive leukocytosis, hyperproteinemia and increased serum levels of C-reactive protein (2.6-fold; $p = 0.001$), IL10 (3.7-fold; $p = 0.029$) and TNF α (4.2-fold; $p = 0.035$). The observed changes were accompanied by elevated metabolic activity of visceral adipose tissue, indicated by hyperleptinemia and increased free radical oxidation intensity. Pairwise positive correlations of serum levels were revealed for leptin and insulin ($r = 0.701$; $p = 0.001$) and leptin and IL10 ($r = 0.523$; $p = 0.012$). Thus, high-fat/high-carbohydrate diet promoted metabolic impairments concomitantly with early signs of systemic inflammation characteristic of MS and obesity.

Keywords: metabolic syndrome, insulin resistance, obesity, inflammation, C-reactive protein, IL10, TNF α

Funding: the study was supported by the Russian Science Foundation, Grant № 22-25-20039, <https://rscf.ru/project/22-25-20039/> and funds of the Tomsk Region Administration.

Author contribution: Birulina JG, Voronkova OV — concept and design, manuscript writing; Ivanov VV, Buyko EE — metabolic syndrome modeling, biochemical blood tests; Shcherbakova MM — blood cytokine assay; Chernyshov NA — literature analysis, hemogram tests; Motlokhova EA — statistical analysis.

Compliance with ethical standards: the study was approved by Ethical Review Board at SibSMU (Protocol № 8201 of 27 March 2020) and carried out in compliance with humanity principles stated in the 86/609 EEC Directive and the Declaration of Helsinki.

 **Correspondence should be addressed:** Julia G. Birulina
Moskovsky Trakt, 2, str. 7, Tomsk, 634050, Russia; birulina20@yandex.ru

Received: 11.08.2022 **Accepted:** 25.08.2022 **Published online:** 30.08.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.043

Хроническое системное воспаление составляет патогенез многих многофакторных неинфекционных заболеваний, в том числе алиментарно-зависимых, таких как сахарный диабет 2-го типа, ожирение, метаболический синдром

(МС). В механизмах развития инсулинорезистентности хроническое низкоинтенсивное воспаление жировой ткани играет ключевую роль [1]. Метаболические условия (гипергликемия, гиперинсулинемия, гиперлипидемия)

способствуют формированию провоспалительного функционального фенотипа клеточных элементов жировой ткани. Макрофаги, инфильтрирующие жировую ткань, фенотипически меняются с противовоспалительных типа M2 на активированные провоспалительные макрофаги типа M1. Гипертрофированные адипоциты и поляризованные резидентные M1-макрофаги секретируют большое количество адипокинов (лептин, резистин и др.), провоспалительных цитокинов (IL6, TNF α , IL1 β и др.) и хемокинов (MCP-1, MIF, CCL-2 и др.), стимулируя инфильтрацию жировой ткани макрофагами-рекрутами [1, 2]. Это способствует самоподдержанию воспалительного процесса и потенцирует инсулинорезистентность адипоцитов.

Развитие хронического субклинического воспаления у пациентов с МС, ассоциированным с ожирением, уже не вызывает сомнений. При этом отсутствуют четкие клиничко-лабораторные критерии основных феноменов хронического системного воспаления, характеризующие варианты его развития, стадийность, выраженность реакций компенсации, повреждения и дезадаптации. Экспериментальные модели на животных — удобный инструмент для анализа ранних и поздних проявлений системной воспалительной реакции, а также механизмов развития хронического системного воспаления при заболеваниях, для которых характерно изменение многих параметров гомеостаза [3].

Одним из наиболее распространенных подходов к созданию животных моделей МС, ассоциированного с ожирением, является использование комбинированной высокожировой диеты с повышенным содержанием углеводов в режиме свободного доступа к корму [4, 5]. Такая диета в большой степени соответствует этиопатогенетическим особенностям алиментарно-конституционального ожирения у человека и, как правило, является устойчивой моделью соответствующих метаболических нарушений — инсулинорезистентности, гипергликемии, дислипидемии и др. Вместе с тем было отмечено, что лишь у части животных-моделей (60–80%) формирование индуцированного диетой ожирения сопровождается дальнейшим развитием спектра метаболических нарушений, в полной мере соответствующего критериям МС [6, 7]. В связи с этим при моделировании МС представляются важными выявление и анализ дополнительных параметров, которые могли бы выступить в качестве потенциальных валидных биомаркеров, адекватно характеризующих патогенез МС и ассоциированных с ним состояний, в том числе хроническое системное воспаление.

Целью исследования были оценка и анализ изменений параметров системной воспалительной реакции у крыс в модели диет-индуцированного МС.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальная модель МС была создана на крысах-самцах Wistar (33 крысы, средняя масса 28,5–36,1 г, возраст на начало исследования — 6 недель). Животные для исследования были получены из вивария НИИФиРМ им. Е. Д. Гольдберга Томского НИМЦ (г. Томск, Россия). Крысы были рандомизированы на контрольную и экспериментальную группу (15 и 18 животных соответственно) и содержались в условиях вивария (температура воздуха — 20–26 °C, относительная влажность воздуха — 40–70%, световой режим — 12:12). Животных

содержали в клетках из полипропилена по три особи в каждой (площадь пола — 1612 см²). Критерии включения животных в эксперимент: отсутствие клинических признаков нарушения здоровья; отклонение массы тела не более 10% от среднего значения. Крысы контрольной группы находились на стандартной диете с соотношением белков, жиров и углеводов — 24% : 6% : 44% (корм «Дельта Фидс»; Биопро, РФ) со свободным доступом к пище и воде. Крысы экспериментальной группы в течение 12 недель находились на высокожировой и высокоуглеводной диете (ВЖВУД), содержащей стандартный лабораторный корм (66%), смешанный с топленым свиным салом (17%), фруктозой (17%), холестерином (0,25%, Cholesterol; Sigma, США) (соотношение белков, жиров и углеводов — 16%:21%:54%), с заменой питьевой воды на 20%-й раствор фруктозы.

Оценку состоятельности сформированной модели критериям МС проводили методами, описанными нами ранее [5, 8]. У животных экспериментальной группы (в сравнении с контрольными) анализировали следующие параметры: уровень артериального давления (система «Систола»; «Нейроботикс», Россия), массу тела (взвешивание на аналитических весах Pioneer PX224, ОНАУС, КНР), удельный вес висцеральной жировой ткани и печени (взвешивание на аналитических весах Pioneer PX224, ОНАУС, КНР; вычисление отношения массы ткани на 100 г массы тела крысы), а также результаты биохимических тестов: уровень глюкозы в крови натощак и в пероральном тесте на толерантность к глюкозе спектрофотометрическим методом с использованием ферментативных наборов (Chronolab; Испания), концентрацию триацилглицеролов, общего холестерина (ХС), холестерина в составе липопротеинов низкой (ХС-ЛПНП), очень низкой (ХС-ЛПОНП) и высокой плотности (ХС-ЛПВП) в сыворотке крови на автоматическом анализаторе Architect c4000 (Abbot; США).

Выведение животных из эксперимента осуществляли методом CO₂-асфиксии. Кровь отбирали из сердца в две пробирки: с активатором свертывания для получения сыворотки и последующего биохимического и иммуноферментного анализа, а также с антикоагулянтом для оценки количественных показателей белой крови.

Для оценки интенсивности воспалительного процесса определяли общее количество и морфологический состав лейкоцитов в крови при помощи автоматического анализатора BC-2800 Vet (Mindray; Китай), концентрацию общего белка методом Брэдфорд, высокочувствительного С-реактивного белка (Rat CRP ELISA Kit, Elabscience Biotechnology; Китай).

Методом иммуноферментного анализа оценивали содержание в сыворотке крови цитокинов IL6, IL10, TNF α (наборы Bender MedSystems GmbH; Австрия), концентрацию инсулина (Insulin Rat ELISA Kit, Thermo Fisher Scientific; США) и лептина (Leptin Rat ELISA Kit, Thermo Fisher Scientific; США). Гомеостатическую модель оценки инсулинорезистентности (HOMA-IR) рассчитывали по следующей формуле:

$$(\text{сывороточный инсулин}) \times (\text{сывороточная глюкоза}) / 22,5.$$

С целью оценки интенсивности локального воспаления в жировой ткани определяли уровень продукции активных форм кислорода (АФК) с помощью красителя с заблокированной флуоресценцией — 2,3-дигидрохлорфлуоресцеина диацетат (ДГХФ-ДА). Для этого фрагменты висцеральной жировой ткани массой 50 мг инкубировали в течение 60 мин в присутствии 10 мкМ

ДГХФ-ДА. Оценивали флуоресценцию при длине волны возбуждения 530 нм и длине волны испускания 485 нм с помощью микропланшетного ридера (Infinite 200 Pro M-plex, Tecan; Швейцария) [9].

Статистическую обработку данных проводили в программе SPSS Statistics 23 (IBM; США). Данные, подчиняющиеся нормальному закону распределения, представлены в виде среднего и стандартного отклонения ($M \pm SD$), не подчиняющиеся — медианы (Me) и межквартильного интервала (Q_{25} ; Q_{75}). Анализ различий между выборками выполняли при помощи t -критерия Стьюдента или U -критерия Манна-Уитни. Пороговое значение достигнутого уровня значимости (p) было принято равным 0,05. Для оценки статистической взаимосвязи между количественными показателями вычисляли коэффициент ранговой корреляции Спирмена или коэффициент парной корреляции Пирсона.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В результате высокожировой и высокоуглеводной диеты (ВЖВУД) продолжительностью 12 недель у животных экспериментальной группы формировались физиологические и лабораторные признаки метаболических нарушений. При сравнении анализируемых параметров у крыс опытной группы в отличие от интактных животных были зарегистрированы артериальная гипертензия, увеличение массы тела, повышение удельного веса печени и висцеральной жировой ткани. При проведении биохимических тестов было выявлено нарушение толерантности к глюкозе (увеличение площади под кривой «концентрация глюкозы–время» (AUC_{0-120})), гипергликемия натощак, а также изменения показателей липидного спектра, которые характеризовались повышением уровней ТАГ, общего ХС, ХС-ЛПНП и ХС-ЛПОНП (табл. 1). Выявленные изменения позволили сделать вывод о состоятельности воспроизведенной модели и ее пригодности для анализа дополнительных критериев МС.

В качестве критерия, свидетельствующего о формировании состояния инсулинорезистентности у экспериментальных животных, была определена концентрация инсулина в крови. У крыс с МС концентрация гормона более чем в 2 раза превышала значения показателя в контрольной группе, а индекс HOMA-IR составил $1,3 \pm 0,4$. У животных опытной группы оказался высоким и уровень гормона жировой ткани лептина, который превышал контрольные значения в среднем в 1,5 раза (табл. 1).

При анализе интенсивности процессов свободнорадикального окисления в висцеральной жировой ткани было установлено статистически значимое повышение продукции АФК у крыс с МС до 2,5 усл. ед., при уровне 1,2 усл. ед. в группе контроля ($p = 0,008$).

В результате биохимического анализа у животных экспериментальной группы было установлено повышение концентрации общего белка в крови в 1,3 раза, а также концентрации С-реактивного белка в среднем в 2,6 раза соответственно, по сравнению со значениями в группе контроля (табл. 1).

У животных опытной группы было зарегистрировано статистически значимое повышение общего числа лейкоцитов в крови. При анализе морфологического состава белой крови было обнаружено увеличение количественного содержания гранулоцитов — как относительного, так и абсолютного их числа (табл. 2).

Сывороточная концентрация IL10 и TNF α в крови у крыс с метаболическими нарушениями, индуцированными ВЖВУД, оказалась выше, чем у здоровых животных, в среднем в 3,7 и 4,2 раза соответственно (табл. 3). При этом повышение уровня IL6 в крови у животных опытной группы оказалось статистически недостоверным.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

К настоящему времени в экспериментальных медико-биологических исследованиях утверждены два основных методических подхода к моделированию МС на мелких грызунах: 1) использование специализированных линий животных, генетически предрасположенных к развитию сахарного диабета, ожирения и сердечно-сосудистых заболеваний; 2) использование различных диет с несбалансированным рационом белков, жиров и углеводов [4, 10]. Оба подхода основаны на индукции избыточного накопления в организме висцерального жира как одного из ключевых патогенетических факторов, опосредующего выраженные нарушения обмена веществ.

Несмотря на широкое использование диет с повышенным содержанием жиров и углеводов для моделирования МС у животных, некоторые исследователи отмечают определенные методические сложности, затрудняющие верификацию его основных проявлений. Например, трудной представляется оценка степени развивающегося висцерального ожирения, поскольку относительные показатели, применимые для человека, такие как индекс массы тела или относительная окружность талии, не позволяют оценить тип формируемого ожирения у экспериментальных животных. В ряде исследований было обнаружено, что эквиваленты МС, характерные для человека (артериальная гипертензия, дислипопроteinемия, гипергликемия), у животных можно воспроизвести лишь частично [11, 12]. В ряде случаев причинами являются недостаточная продолжительность экспериментального воздействия диетой, возрастные, гендерные, генетические особенности инбредных и аутбредных линий экспериментальных животных, погрешности составления пищевого рациона и режима питания и т. д.

Одними из критериев для верификации МС у лабораторных животных могут служить параметры, характеризующие метаболическую активность жировой ткани. В экспериментах было показано наличие корреляционных взаимосвязей отношения концентрации лептин/грелин с изменениями массы тела, селезенки и жировой ткани у крыс линии Wistar в модели гиперлипидемии, а также уровнями цитокинов, участвующих в регуляции воспаления (MCP-1, M-CSF, IL18 и RANTES), что указывает на информативность данных критериев как биомаркеров направленности и тяжести обменных нарушений при МС и ожирении [13].

Один из патогенетических факторов метаболического синдрома — хроническое воспаление жировой ткани, развивающееся на фоне инсулинорезистентности, сопряженной с гипергликемией и дислипопроteinемией [1, 2]. Высокоактивные вещества, вырабатываемые адипоцитами и клетками стромы (адипокины, провоспалительные цитокины), способствуют усилению макрофагальной инфильтрации жировой ткани и, таким образом, поддерживают локальное воспаление [14].

При анализе метаболической активности клеточных элементов висцерального жира крыс, находившихся на

Таблица 1. Физиологические показатели и биохимические маркеры метаболического синдрома у крыс, $M \pm SD$

Параметр	Группа		<i>p</i>
	Контрольная, <i>n</i> = 15	Опытная, <i>n</i> = 18	
Масса тела, г	433,32 ± 39,4	489,1 ± 47,9	0,01
Систолическое АД, мм рт. ст.	130,4 ± 9,5	145,1 ± 8,7	0,01
Диастолическое АД, мм рт. ст.	86,5 ± 9,3	101,4 ± 12,2	0,028
Удельный вес жировой ткани, г	2,2 ± 0,22,2 ± 0,2	4,3 ± 0,64,3 ± 0,6	0,001
Удельный вес печени, г	3,1 ± 0,43,1 ± 0,4	4,2 ± 0,54,2 ± 0,5	0,001
Глюкоза натощак, ммоль/л	4,9 ± 0,5	7,6 ± 0,4	0,001
AUC ₀₋₁₂₀ , ммоль/л*120 мин минAUC ₀₋₁₂₀ , ммоль/л*120 мин	752,2 ± 50,4	940,9 ± 55,8	0,001
Общий ХС, ммоль/л	1,7 ± 0,2	2,3 ± 0,3	0,001
ХС-ЛПВП, ммоль/л	0,6 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,003
ХС-ЛПНП ммоль/л,	0,9 ± 0,2	1,4 ± 0,4	0,02
ХС-ЛПОНП ммоль/л,	0,3 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,03
ТАГ, ммоль/л	0,7 ± 0,2	1,7 ± 0,5	0,001
Инсулин, пмоль/л	11,2 ± 0,8	24,2 ± 5,6	0,001
НОМА-IR	0,4 ± 0,1	1,3 ± 0,4	0,004
Лептин, нг/мл	3,1 ± 0,3	4,5 ± 0,1	0,01
Общий белок, г/л	52,7 ± 3,4	66,7 ± 3,8	0,015
С-реактивный белок, нг/мл	4,0 ± 0,4	10,5 ± 1,3	0,001

Примечание: AUC₀₋₁₂₀ — площадь под кривой «концентрация глюкозы — время» в тесте толерантности к глюкозе; *p* — различия по сравнению с группой контроля.

12-недельной ВЖВУД, мы зарегистрировали усиление активности свободнорадикальных реакций — уровень спонтанной продукции АФК превышал соответствующие значения в группе контроля в 2 раза.

О высокой секреторной активности адипоцитов у крыс опытной группы можно судить и по уровню лептина в крови. В нашем исследовании концентрация гормона у животных экспериментальной группы превышала контрольные значения в среднем в 1,5 раза (табл. 1). При этом между сывороточными концентрациями лептина и инсулина была выявлена средняя прямая корреляционная зависимость ($r = 0,701$; $p = 0,001$).

Лептин преимущественно секретируют адипоциты белой жировой ткани, а его концентрация в крови коррелирует с объемом висцерального жира. В физиологических условиях лептин ингибирует секрецию инсулина поджелудочной железой [15]. Наиболее вероятно, что обнаруженная нами гиперлептинемия при МС носит компенсаторный характер на фоне инсулинорезистентности и повышении концентрации инсулина в крови. Известно также, что на фоне метаболических нарушений (гипергликемии и дислипидотеинемии) происходит снижение экспрессии лептиновых рецепторов на клетках и развивается их резистентность [16, 17].

Структурные особенности лептина позволяющие отнести его к семейству провоспалительных адипокинов. Лептин принимает участие в регуляции хемотаксиса и активации нейтрофилов, в процессах дифференцировки Т-лимфоцитов и поддержании пула NK-клеток. На гуморальном уровне лептин стимулирует продукцию TNF α и IL6. Повышенная секреция лептина адипоцитами способствует накоплению макрофагов и облегчает их проникновение в жировую ткань посредством стимуляции ангиогенеза [18].

Известно, что метаболические условия активации клеточных элементов жировой ткани, такие как

концентрация глюкозы, инсулина, жирных кислот, определяют ее цитокиновый профиль. Например, свободные жирные кислоты в высокой концентрации могут активировать рецепторы макрофагов TLR4 и опосредованно включать экспрессию генов, ответственных за наработку медиаторов воспаления [2, 14]. При этом в патогенезе воспаления жировой ткани формируется «порочный круг», так как системные эффекты некоторых провоспалительных цитокинов выражаются в активации синтеза жирных кислот и повышении их концентрации в крови за счет угнетения секреции адипонектина и регуляции продукции других цитокинов.

В нашем исследовании мы зарегистрировали статистически значимое повышение концентрации TNF α и IL10 в сыворотке крови у крыс опытной группы по сравнению с контрольной (табл. 3).

На ранних этапах воспаления баланс между защитно-приспособительными и патологическими воспалительными реакциями обеспечивают противовоспалительные цитокины (IL10, IL13, TGF β), которые ограничивают повреждение ткани, снижая экспрессию молекул главного комплекса гистосовместимости II класса, коstimуляторных и других молекул на иммунокомпетентных клетках [19]. Вероятно, этим можно объяснить выявленное нами повышение уровня противовоспалительного IL10 в сыворотке крови у животных опытной группы на фоне метаболических нарушений. Косвенно подтверждает это выявленная средняя положительная корреляционная взаимосвязь между уровнем IL10 и концентрацией лептина ($r = 0,523$; $p = 0,012$).

Следует отметить, что при прогрессировании МС и ожирения наработка противовоспалительных цитокинов, а также гормонов, обладающих противовоспалительным эффектом (грелина, адипонектина) в жировой ткани может снижаться, что приводит к повышению инфильтрации жировой ткани мононуклеарами и усугубляет воспаление

Таблица 2. Гематологические показатели крыс контрольной и опытной групп, Ме (Q_{25} ; Q_{75})

Параметр	Группа		<i>p</i>
	Контрольная, <i>n</i> = 15	Опытная, <i>n</i> = 18	
Лейкоциты, $10^9/\text{л}$	9,9 (9,4; 10,9)	13,7 (11,4; 15,0)	0,001
Лимфоциты, $10^9/\text{л}$	7,6 (5,9; 8,3)	7,1 (6,4; 8,5)	0,84
Моноциты, $10^9/\text{л}$	0,4 (0,2; 0,4)	0,5 (0,3; 0,4)	0,166
Гранулоциты, $10^9/\text{л}$	2,5 (1,7; 3,6)	3,9 (3,2; 4,4)	0,003
Лимфоциты, %	65,3 (64,2; 67,6)	64,2 (62,7; 66,2)	0,343
Моноциты, %	3,4 (3,0; 3,6)	3,5 (3,1; 4,0)	0,1
Гранулоциты, %	28,2 (25,9; 31,3)	33,2 (31,5; 34,2)	0,001

Примечание: *p* — различия по сравнению с группой контроля.

Таблица 3. Концентрация цитокинов в крови крыс контрольной и опытной групп, Ме (Q_{25} ; Q_{75})

Параметр	Группа		<i>p</i>
	Контрольная, <i>n</i> = 15	Опытная, <i>n</i> = 18	
IL6, пг/мл	5,5 (2,3; 6,3)	7,8 (4,7; 14,1)	0,152
IL10, пг/мл	11,8 (6,0; 23,8)	43,3 (21,9; 54,7)	0,029
TNF α , пг/мл	2,6 (2,6; 5,2)	10,8 (6,4; 11,7)	0,035

Примечание: *p* — различия по сравнению с группой контроля.

[20, 21]. Как правило, это воспаление низкой интенсивности, ввиду того, что факторы противовоспалительной резистентности способны длительное время сдерживать развитие генерализованного процесса и препятствовать развитию феномена вторичного повреждения при хронической системной альтерации. Поэтому, в отличие от острого, для хронического воспаления характерна меньшая выраженность изменений системных показателей.

В процессе исследования мы оценивали изменения параметров, характеризующих общие проявления воспаления, ассоциированного с висцеральной жировой тканью. Наряду с изменением концентрации цитокинов у животных с МС были выявлены повышение общего числа лейкоцитов, увеличение в гемограмме содержания гранулоцитов, повышение концентрации общего и С-реактивного белка в сыворотке крови по сравнению с соответствующими параметрами у интактных животных.

Многие воспалительные состояния сопровождается повышенной продукцией белков острой фазы, в основном высвобождаемых гепатоцитами. Исследования показали, что при патологических состояниях адипоциты белой жировой ткани способны также генерировать высокий уровень С-реактивного белка, что усугубляет нарушение метаболизма глюкозы и резистентность к инсулину [22, 23].

Отдельные компоненты МС могут быть причиной реактивного лейкоцитоза. В экспериментах на животных показано, что диеты с высоким содержанием жиров приводят к миелоидной гиперплазии, особенно нейтрофильного клеточного паттерна [24]. В ряде исследований у людей с нарушением толерантности к глюкозе и ожирением была установлена положительная корреляционная взаимосвязь между антропометрическими и биохимическими показателями (индекс массы тела, артериальная гипертензия, гиперинсулинемия, дислипидопроteinемия) и повышенным числом лейкоцитов в крови [25–27]. В механизмах развития лейкоцитоза обсуждается возможная роль лептина. Установлено, что

лептин и его рецепторы являются частью сигнального пути, стимулирующего гемопоэз в красном костном мозге [25].

Схожими эффектами в отношении гемопоэтических клеток и зрелых лейкоцитов обладают конечные продукты гликирования, АФК и провоспалительные цитокины. Последние являются важными индукторами лейкоцитоза, особенно нейтрофилии, посредством множества механизмов, включая демаргинацию внутрисосудистых нейтрофилов, ускорение высвобождения нейтрофилов из костного мозга и усиление гранулоцитопоэза в костном мозге [28, 29].

ВЫВОДЫ

В результате проведенного эксперимента у крыс с МС наряду с висцеральным ожирением и нарушениями углеводного и липидного обменов (гиперинсулинемией, гипергликемией, дислипидопроteinемией) зарегистрированы общие признаки воспаления: реактивный лейкоцитоз, гиперпротеинемия, повышение концентрации в крови С-реактивного белка и цитокинов (TNF α , IL10). Выявленные изменения происходили на фоне повышения метаболической активности висцеральной жировой ткани, о чем свидетельствовали гиперлептинемия и повышение интенсивности процессов свободнорадикального окисления. Была обнаружена положительная корреляционная взаимосвязь между уровнями лептина и инсулина в крови, а также между сывороточной концентрацией лептина и IL10. Таким образом, экспериментальное воздействие на крыс ВЖВУД продолжительностью 12 недель наряду с метаболическими нарушениями позволяет воспроизвести ранние признаки системного воспаления, характерные для МС и ожирения. Мы считаем, что диет-индуцированные модели МС могут быть удобным инструментом для исследования механизмов развития ранних и поздних осложнений МС, опосредованных влиянием патогенетических факторов хронического системного воспаления.

Литература

1. Крюков Н. Н., Гинзбург М. М., Киселева Е. В. Современный взгляд на роль асептического воспаления жировой ткани в генезе ожирения и метаболического синдрома. Артериальная гипертензия. 2013; 19 (4): 305–310.
2. McCracken E, Monaghan M, Sreenivasan S. Pathophysiology of the metabolic syndrome. Clin Dermatol. 2018; 36 (1): 14–20.
3. Макарова М. Н., Макаров В. Г. Диет-индуцированные модели метаболических нарушений. Экспериментальный метаболический синдром. Лабораторные животные для научных исследований. 2018; 1. Доступно по ссылке: <https://labanimalsjournal.ru/ru/2618723x-2018-01-08>.
4. Кравчук, Е. Н., Галагудза, М. М. Экспериментальные модели метаболического синдрома. Артериальная гипертензия. 2014; 20 (5): 377–83.
5. Бирulina Ю. Г., Иванов В. В., Буйко Е. Е., Трубаева О. А., Петрова И. В., Гречишников А. Ю. и др. Влияние высокожировой и высокоуглеводной диеты на клетки крови крыс. Бюллетень сибирской медицины. 2021; 20 (3): 6–12.
6. Чернышева М. Б., Цветков И. С., Диатроптов М. Е., Макарова О. В. Морфологические изменения внутренних органов и метаболические нарушения при экспериментальном алиментарном ожирении. Клиническая и экспериментальная морфология. 2016; 1 (17): 44–51.
7. Henning RJ. Obesity and obesity-induced inflammatory disease contribute to atherosclerosis: a review of the pathophysiology and treatment of obesity. Am J Cardiovasc Dis. 2021; 11 (4): 504–29.
8. Бирulina Ю. Г., Иванов В. В., Буйко Е. Е., Быков В. В., Носарев А. В., Ковалев И. В., Смаглий Л. В., Гусакова С. В., авторы. Способ моделирования диет-индуцированного метаболического синдрома. ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, патентообладатель. Патент РФ № №2740007 от 30.12.2020.
9. Liu L, Zou P, Zheng L, Linarelli LE, Amarell S, Passaro A, et al. Tamoxifen reduces fat mass by boosting reactive oxygen species. Cell Death Dis. 2017; 6 (1): e1586.
10. Байрашева В. К., Пчелин И. Ю., Егорова А. Э., Василькова О. Н., Корнюшин О. В. Экспериментальные модели алиментарного ожирения у крыс. Juvenis Scientia. 2019; 9–10: 8–13.
11. Lucero D, Olano C, Bursztyn M, Morales C, Stranges A, Friedman S, et al. Supplementation with n-3, n-6, n-9 fatty acids in an insulin resistance animal model: Does it improve VLDL quality? Food Funct. 2017; 8 (5): 2053–61.
12. Kwitek AE. Rat models of metabolic syndrome. Methods Mol Biol. 2019; 2018: 269–85.
13. Ригер Н. А., Шипелин В. А., Апрытин С. А., Гмошинский И. В. Иммунологические маркеры алиментарно-индуцированной гиперлипидемии у крыс линии Вистар. Вопросы питания. 2019; 88 (3): 44–52.
14. Романцова Т. И., Сыч Ю. П. Иммунометаболизм и метавоспаление при ожирении. Ожирение и метаболизм. 2019; 16 (4): 3–17.
15. Ghadge AA, Khaire AA. Leptin as a predictive marker for metabolic syndrome. Cytokine. 2019; 121: 154735.
16. Gonzalez-Carter D, Goode AE, Fiamengo R, Dunlop IE, Dexter DT, Porter AE. Inhibition of Leptin-ObR Interaction Does not Prevent Leptin Translocation Across a Human Blood-Brain Barrier Model. J Neuroendocrinol. 2016; 28 (6). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jne.12392>.
17. Kiernan K, MacIver NJ. The Role of the Adipokine Leptin in Immune Cell Function in Health and Disease. Front Immunol. 2021; 11: 622468.
18. Frühbeck G, Catalán V, Rodríguez A, et al. Normalization of adiponectin concentrations by leptin replacement in ob/ob mice is accompanied by reductions in systemic oxidative stress and inflammation. Scientific Reports. 2017; 7 (1): 2752.
19. Lee B-C, Lee J. Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — Molecular Basis of Disease. 2014; 1842 (3): 446–62.
20. Танянский Д. А., Денисенко А. Д. Влияние адипонектина на обмен углеводов, липидов и липопротеинов: анализ сигнальных механизмов. Ожирение и метаболизм. 2021; 18 (2): 103–11.
21. Ritchie IR, Dyck DJ. Rapid loss of adiponectin-stimulated fatty acid oxidation in skeletal muscle of rats fed a high fat diet is not due to altered muscle redox state. PLoS One. 2012; 7 (12): e52193.
22. Memoli B, Procino A, Calabrò P, Esposito P, Grandalano G, Pertosa G, et al. Inflammation may modulate IL6 and C-reactive protein gene expression in the adipose tissue: the role of IL6 cell membrane receptor. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2007; 293: E1030–E1035.
23. Kaneko H, Anzai T, Nagai T, Anzai A, Takahashi T, Mano Y, et al. Human C-reactive protein exacerbates metabolic disorders in association with adipose tissue remodeling. Cardiovasc Res. 2011; 1: 546–55.
24. do Carmo LS, Rogero MM, Paredes-Gamero EJ, Nogueira-Pedro A, Xavier JG, Cortezet M, et al. A high-fat diet increases interleukin-3 and granulocyte colony-stimulating factor production by bone marrow cells and triggers bone marrow hyperplasia and neutrophilia in Wistar rats. Exp Biol Med (Maywood). 2013; 238 (4): 375–84.
25. Purdy JC, Shatzel JJ. The hematologic consequences of obesity. Eur J Haematol. 2021; 106 (3): 306–19.
26. Farhangi MA, Keshavarz SA, Eshraghian M, Ostadrahimi A, Saboor-Yaraghi AA. White blood cell count in women: relation to inflammatory biomarkers, haematological profiles, visceral adiposity, and other cardiovascular risk factors. J Health Popul Nutr. 2013; 31 (1): 58–64.
27. Herishanu Y, Rogowski O, Polliack A, Marilus R. Leukocytosis in obese individuals: possible link in patients with unexplained persistent neutrophilia. European journal of haematology. 2006; 76 (6): 516–20.
28. Pini M, Rhodes DH, Fantuzzi G. Hematological and acute-phase responses to diet-induced obesity in IL6 KO mice. Cytokine. 2011; 56 (3): 708–16.
29. Netzer N, Gatterer H, Faulhaber M, Burtscher M, Pramsohler S, Pesta D. Hypoxia, oxidative stress and fat. Biomolecules. 2015; 5: 1143–50.

References

1. Kryukov NN, Ginzburg MM, Kiseleva EV. Sovremennyy vzglyad na rol' asepticeskogo vospaleniya zhirovoy tkani v geneze ozhireniya i metabolicheskogo sindroma. Arterial'naya gipertenziya. 2013; 19 (4): 305–10. Russian.
2. McCracken E, Monaghan M, Sreenivasan S. Pathophysiology of the metabolic syndrome. Clin Dermatol. 2018; 36 (1): 14–20.
3. Makarova MN, Makarov VG. Diet-inducirovannye modeli metabolicheskix narushenij. Ehksperimental'nyj metabolicheskij sindrom. Laboratornye zhivotnye dlya nauchnyx issledovanij. 2018; 1. Dostupno po ssylke: <https://labanimalsjournal.ru/ru/2618723x-2018-01-08>. Russian.
4. Kravchuk EN, Galagudza MM. Ehksperimental'nye modeli metabolicheskogo sindroma. Arterial'naya gipertenziya. 2014; 20 (5): 377–83. Russian.
5. Birulina YuG, Ivanov VV, Buyko EE, Trubacheva OA, Petrova IV, Grechishnikova AY, i dr. Vliyanie vysokozhirovoy i vysokouglevodnoj diety na kletki krovi krys. Byulleten' sibirskoy mediciny. 2021; 20 (3): 6–12. Russian.
6. Chernysheva MB, Tsvetkov IS, Diatroptov ME, Makarova OV. Morfologicheskie izmeneniya vnutrennix organov i metabolicheskie narusheniya pri ehksperimental'nom alimentarnom ozhirenii. Klinicheskaya i ehksperimental'naya morfologiya. 2016; 1 (17): 44–51. Russian.
7. Henning RJ. Obesity and obesity-induced inflammatory disease

- contribute to atherosclerosis: a review of the pathophysiology and treatment of obesity. *Am J Cardiovasc Dis.* 2021; 11 (4): 504–29.
8. Birulina YuG, Ivanov VV, Buyko EE, Bykov VV, Nosarev AV, Kovalev IV, Smaglij LV, Gusakova SV, avtory. Sposob modelirovaniya diet-inducirovannogo metabolicheskogo sindroma. FGBOU VO SibGMU Minzdrava Rossii, patentoobladatel'. Patent RF # #2740007 ot 30.12.2020. Russian
 9. Liu L, Zou P, Zheng L, Linarelli LE, Amarell S, Passaro A, et. al. Tamoxifen reduces fat mass by boosting reactive oxygen species. *Cell Death Dis.* 201; 6 (1): e1586.
 10. Bayrasheva VK, Pchelin IYu, Egorova AEh, Vasilkova ON, Korniyushin OV. Ehksperimental'nye modeli alimentarnogo ozhireniya u krys. *Juvenis Scientia.* 2019; 9–10: 8–13. Russian.
 11. Lucero D, Olano C, Bursztyn M, Morales C, Stranges A, Friedman S, et al. Supplementation with n–3, n–6, n–9 fatty acids in an insulin resistance animal model: Does it improve VLDL quality? *Food Funct.* 2017; 8 (5): 2053–61.
 12. Kwitek AE. Rat models of metabolic syndrome. *Methods Mol Biol.* 2019; 2018: 269–85.
 13. Riger NA, Shipelin VA, Apriyatin SA, Gmoshinski IV. Immunologicheskie markery alimentarno-inducirovannoy giperlipidemii u krys linii Vistar. *Voprosy pitaniya.* 2019; 88 (3): 44–52. Russian.
 14. Romantsova TI, Sych YuP. Immunometabolizm i metavospalenie pri ozhireнии. *Ozhirenie i metabolism.* 2019; 16 (4): 3–17. Russian.
 15. Ghadge AA, Khaire AA. Leptin as a predictive marker for metabolic syndrome. *Cytokine.* 2019; 121: 154735.
 16. Gonzalez-Carter D, Goode AE, Fiammengio R, Dunlop IE, Dexter DT, Porter AE. Inhibition of Leptin-ObR Interaction Does not Prevent Leptin Translocation Across a Human Blood-Brain Barrier Model. *J Neuroendocrinol.* 2016; 28 (6). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jne.12392>.
 17. Kiernan K, MacIver NJ. The Role of the Adipokine Leptin in Immune Cell Function in Health and Disease. *Front Immunol.* 2021; 11: 622468.
 18. Frühbeck G, Catalán V, Rodríguez A, et al. Normalization of adiponectin concentrations by leptin replacement in ob/ob mice is accompanied by reductions in systemic oxidative stress and inflammation. *Scientific Reports.* 2017; 7 (1): 2752.
 19. Lee B-C, Lee J. Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — Molecular Basis of Disease.* 2014; 1842 (3): 446–62.
 20. Tanyanskiy DA, Denisenko AD. Vliyanie adiponektina na obmen uglevodov, lipidov i lipoproteinov: analiz signal'nykh mexanizmov. *Ozhirenie i metabolism.* 2021; 18 (2): 103–11. Russian.
 21. Ritchie IR, Dyck DJ. Rapid loss of adiponectin-stimulated fatty acid oxidation in skeletal muscle of rats fed a high fat diet is not due to altered muscle redox state. *PLoS One.* 2012; 7 (12): e52193.
 22. Memoli B, Procino A, Calabrò P, Esposito P, Grandaliano G, Pertosa G, et al. Inflammation may modulate IL6 and C-reactive protein gene expression in the adipose tissue: the role of IL6 cell membrane receptor. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007; 293: E1030–E1035.
 23. Kaneko H, Anzai T, Nagai T, Anzai A, Takahashi T, Mano Y, et al. Human C-reactive protein exacerbates metabolic disorders in association with adipose tissue remodeling. *Cardiovasc Res.* 2011; 1: 546–55.
 24. do Carmo LS, Rogero MM, Paredes-Gamero EJ, Nogueira-Pedro A, Xavier JG, Cortezet M, et al. A high-fat diet increases interleukin-3 and granulocyte colony-stimulating factor production by bone marrow cells and triggers bone marrow hyperplasia and neutrophilia in Wistar rats. *Exp Biol Med (Maywood).* 2013; 238 (4): 375–84.
 25. Purdy JC, Shatzel JJ. The hematologic consequences of obesity. *Eur J Haematol.* 2021; 106 (3): 306–19.
 26. Farhangi MA, Keshavarz SA, Eshraghian M, Ostadrahimi A, Saboor-Yaraghi AA. White blood cell count in women: relation to inflammatory biomarkers, haematological profiles, visceral adiposity, and other cardiovascular risk factors. *J Health Popul Nutr.* 2013; 31 (1): 58–64.
 27. Herishanu Y, Rogowski O, Polliack A, Marilus R. Leukocytosis in obese individuals: possible link in patients with unexplained persistent neutrophilia. *European journal of haematology.* 2006; 76 (6): 516–20.
 28. Pini M, Rhodes DH, Fantuzzi G. Hematological and acute-phase responses to diet-induced obesity in IL6 KO mice. *Cytokine.* 2011; 56 (3): 708–16.
 29. Netzer N, Gatterer H, Faulhaber M, Burtscher M, Pramsohler S, Pesta D. Hypoxia, oxidative stress and fat. *Biomolecules.* 2015; 5: 1143–50.

EPOR/CD131-ОПОСРЕДОВАННАЯ РЕТИНОПРОТЕКЦИЯ ПРИ РОТЕНОН-ИНДУЦИРОВАННОЙ НЕЙРОТОКСИЧНОСТИ СВЯЗАНА С УВЕЛИЧЕНИЕМ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ АУТОФАГИИ

В. О. Солдатов¹✉, М. В. Покровский¹, О. А. Пученкова¹, Н. С. Жунусов¹, А. М. Краюшкина¹, А. В. Гречина², М. О. Солдатова³, К. Н. Лапин⁴, О. Ю. Бушуева³

¹ Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия

² Первый московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова, Москва, Россия

³ Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия

⁴ Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии, Москва, Россия

Митохондриальная дисфункция является ключевым драйвером развития нейродегенерации. Целью исследования было оценить протективный потенциал стимуляции EPOR/CD131, гетеродимерного рецептора эритропоэтина (ЕРО), при нейродегенерации, вызванной нарушением функции митохондрий. В качестве агонистов EPOR/CD131 были использованы ЕРО или pHBSF, эффективность которых оценивали в условиях *in vivo* и *in vitro*. В модели ротенон-индуцированной ретинопатии однократная инъекция 10 мкг/кг ЕРО или 5 мкг/кг pHBSF привела к значительному снижению дегенерации ганглионарных клеток сетчатки ($p < 0,05$). Кроме того, инкубация в 500 нМ растворах ЕРО и pHBSF резко увеличила выживаемость первичной мышиной нейроглиальной культуры, обработанной ротеноном ($p < 0,005$). Примечательно, что применение агонистов EPOR/CD131 привело к увеличению экспрессии мРНК LC3A, ATG7, Beclin-1, Паркина и BNIP3, что свидетельствует об активации аутофагии и митофагии как потенциальном механизме митопротективного действия.

Ключевые слова: митохондриальная дисфункция, ротенон-индуцированная ретинопатия, рецептор EPOR/CD131, эритропоэтин, pHBSF

Финансирование: государственное задание «Лаборатория геномного редактирования для биомедицины и ветеринарии FZVG-2021-0016».

Вклад авторов: В. О. Солдатов — идея и дизайн эксперимента, написание статьи; М. В. Покровский, А. В. Дейкин — консультация по идее и дизайну исследования; О. А. Пученкова — моделирование ротенон-индуцированной ретинопатии, забор материала для гистологического исследования и анализа экспрессии целевых генов; Н. С. Жунусов — моделирование ротенон-индуцированной ретинопатии, исследование цитопротективной активности ротенона *in vitro*; А. М. Краюшкина — исследование цитопротективной активности ротенона *in vitro*; А. В. Гречина — проведение морфологических исследований; О. Ю. Бушуева — выделение РНК, проведение количественной ПЦР; М. О. Солдатова — выделение РНК, проведение количественной ПЦР.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Белгородского государственного национального исследовательского университета (протокол № 06-07/21 от 15 июля 2021 г.). Все процедуры выполняли согласно Положению о лабораторной практике в РФ 2003 г. с соблюдением требований Директивы Европейского сообщества (86/609 EC) и рекомендаций руководства ARRIVE.

✉ Для корреспонденции: Владислав Олегович Солдатов
ул. Победы, д. 85, г. Белгород, 308015, Россия; pharmsoldatov@gmail.com

Статья получена: 11.07.2022 Статья принята к печати: 01.08.2022 Опубликована онлайн: 12.08.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.040

EPOR/CD131-MEDIATED ATTENUATION OF ROTENONE-INDUCED RETINAL DEGENERATION IS ASSOCIATED WITH UPREGULATION OF AUTOPHAGY GENES

Soldatov VO¹✉, Pokrovsky MV¹, Puchenkova OA¹, Zhunusov NS¹, Krayushkina AM¹, Grechina AV², Soldatova MO³, Lapin KN⁴, Bushueva OYu³

¹ Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia

² Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

³ Kursk State Medical University, Kursk, Russia

⁴ Federal Research and Clinical Center for Resuscitation and Rehabilitology, Moscow, Russia

Mitochondrial dysfunction is a key driver of neurodegeneration. This study aimed to evaluate the protective potential of EPOR/CD131 (heterodimeric erythropoietin receptor) stimulation in the neurodegeneration caused by rotenone-induced mitochondrial dysfunction. The effects of erythropoietin (EPO) and an EPO mimetic peptide pHBSF were assessed using *in vivo* and *in vitro* models. Single injections of 10 µg/kg EPO or 5 µg/kg pHBSF significantly alleviated the degeneration of ganglion cells of the retina in a rotenone-induced retinopathy in rats ($p < 0.05$). Consistently, *in vitro* exposure of rotenone-treated murine primary neuroglial cultures to 500 nM EPO or pHBSF significantly rescued the survival of the cells ($p < 0.005$). The observed enhancement of LC3A, ATG7, Beclin-1, Parkin and BNIP3 mRNA expression by EPOR/CD131 agonists implicates the autophagy and mitophagy activation as a plausible mitoprotective mechanism.

Keywords: mitochondrial dysfunction, rotenone-induced retinopathy, EPOR/CD131 receptors, erythropoietin, pHBSF

Funding: State Assignment "Laboratory for Genome Editing in Biomedicine and Veterinary FZVG-2021-0016".

Author contribution: Soldatov VO — concept and design of the study, writing of the manuscript; Pokrovsky MV, Lapin KN — consulting on the concept and design of the study; Puchenkova OA — collection of samples for histological examination and target gene expression analysis; Puchenkova OA, Zhunusov NS — modeling of the rotenone-induced retinal degeneration; Zhunusov NS, Krayushkina AM — *in vitro* assay of rotenone cytoprotective activity; Grechina AV — morphological study; Bushueva OYu, Soldatova MO — RNA extraction, quantitative PCR assay.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the ethical committee of the Belgorod State National Research University (Protocol № 06-07/21 of 15 July 2021); all procedures were performed in accordance with the Regulations on Laboratory Practice in the Russian Federation of 2003, in compliance with the 86/609 EEC Directive and ARRIVE guidelines.

✉ Correspondence should be addressed: Vladislav O. Soldatov
Pobedy, 85, Belgorod, 308015, Russia; pharmsoldatov@gmail.com

Received: 11.07.2022 Accepted: 01.08.2022 Published online: 12.08.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.040

Несмотря на значительные успехи, достигнутые в области изучения физиологии и патологии мозга, прогресс в лечении нейродегенеративных заболеваний (НЗ), одной из главных групп патологий нервной системы, остается относительно скромным. В то же время ввиду увеличения средней продолжительности жизни населения, бремя НЗ приобретает все большую медико-социальную значимость [1]. При этом на сегодняшний день отсутствуют средства этиотропной терапии нейродегенерации, а существующие подходы патогенетической и симптоматической направленности очень ограниченно влияют на исходы заболеваний. Все это обуславливает актуальность поиска новых эффективных стратегий нейропротекции. Отдельный интерес фармакотерапия НЗ представляет для офтальмологии, поскольку многие заболевания сетчатки тоже имеют нейродегенеративную природу [2].

Аномалии митохондриальной функции рассматривают как ключевое звено нейронной дегенерации [3]. Показано, что нарушение митохондриальной функции является не следствием, а драйвером развития НЗ [4]. В связи с исключительной важностью энергетического обмена одной из основных задач клетки является поддержание пула здоровых митохондрий. При этом ключевым механизмом, предотвращающим накопление дефектных митохондрий, служит митофагия [5]. Термин «митофагия», впервые предложенный Лемастерсом [6], относится к процессу избирательной деградации митохондрий посредством макроаутофагии [7]. Два основных пути митофагии включают PINK1/паркин-опосредованную и рецептор-опосредованную митофагию [8].

В итоге элиминация поврежденных митохондрий приводит к снижению окислительного стресса и увеличению эффективности энергетического обмена клетки [9]. Таким образом, стимуляцию митофагии

можно рассматривать как эффективный подход к нейропротекции. Более того, активация аутофагии в целом приводит к снижению перегрузки нейронов неправильно свернутыми белками и белковыми агрегатами, которые являются основным патоморфологическим субстратом при нейродегенеративном процессе [10].

В качестве потенциальной стратегии нейропротекции, которая может быть связана с активацией аутофагии и улучшением функции митохондрий, может быть рассмотрена фармакологическая активация гетеродимерного рецептора эритропоэтина (EPO) EPOR/CD131 [11]. Ранее для агонистов EPOR/CD131 была показана нейропротективная активность [12–14] и способность активировать аутофагию [15]. Цель работы — оценить нейропротективную активность эритропоэтина (EPO) и его пептидного агониста pHBP, избирательно стимулирующего гетеродимерный рецептор EPOR/CD131.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для оценки митотропных эффектов в качестве модели была выбрана ротеноновая токсичность в условиях *in vivo* и *in vitro*. Пестицид ротенон прерывает митохондриальную дыхательную цепь, блокируя комплекс I. Воздействие ротенона способно индуцировать клеточные изменения, характерные для митохондриальных заболеваний и нейродегенерации [16].

Животные

Исследование проводили на 24 самцах крыс (питомник «Столбовая»; Московская область, Россия), трех самках мышей линии CD-1 (питомник Пушино; Московская область, Россия) и 24 новорожденных мышатах. До и во

Таблица. Праймеры для оценки экспрессии целевых генов

Ген (кодируемый белок)	Последовательность праймера	Длина продукта (п.н.)
Маркер ретикулярной дегенерации		
Nefl (NEFL)	F: 5'-GGAGTACCAGGACCTCCTCA-3'	102
	R: 5'-CTGGTGAAACTGAGCCTGGT-3'	
Гены, регулирующие аутофагию/митофагию		
Becn1 (Beclin 1)	F: 5'-CAGCTGGACACTCAGCTCAA-3'	99
	R: 5'-CTGTTCACTGTGCGCCTCAT-3'	
Map1lc3a (LC3A)	F: 5'-TTGGTCAAGATCATCCGGCG-3'	104
	R: 5'-TCAGCGATGGGTGTGGATAC-3'	
Atg7 (ATG7)	F: 5'-TCCTGGCCAAGGTGTTAACT	104
	R: 5'-ACTCATGTCCCAGATCTCAGC-3'	
Prkn (Паркин)	F: 5'-TGCCCATTTGAAAAGAATGGAGG-3'	95
	R: 5'-GTTCCACTCACAGCCACAGT-3'	
Bnip3 (BNIP3)	F: 5'-AACAGCACTCTGTCTGAGGA-3'	100
	R: 5'-GCCGACTTGACCAATCCCA-3'	
Гены воспалительного ответа		
Il1b (IL1b)	F: 5'-GGCTGACAGACCCCAAAAGA-3'	101
	R: 5'-TGTCGAGATGCTGCTGTGAG-3'	
Il6 (IL6)	F: 5'-CTCATTTCTGTCTCGAGCCAC-3'	105
	R: 5'-AGAAGGCAACTGGCTGGAAG-3'	
Гены домашнего хозяйства		
Actb (B-actin)	F: 5'-CCACCCGCGAGTACAACC-3'	95
	R: 5'-GACGACGAGCGCAGCGATA-3'	

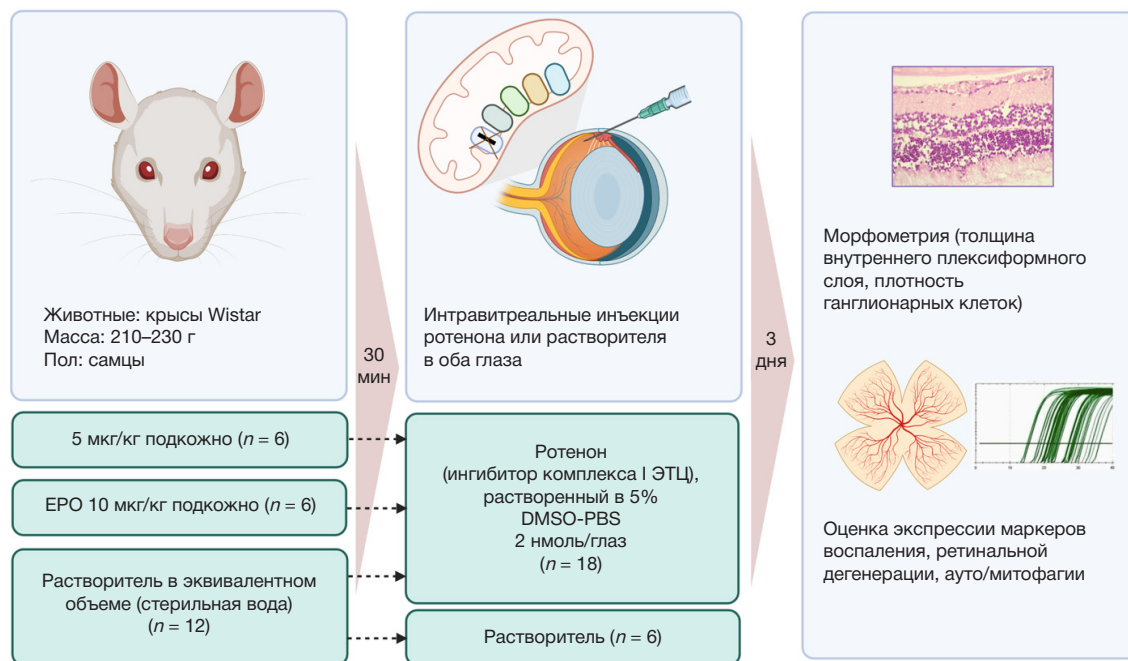


Рис. 1. Схема исследования ретинопротективной активности агонистов EPOR/CD131 при ротенон-индуцированной ретинопатии

время выполнения исследования животных содержали в помещениях с искусственным освещением (режим 12/12 ч) при температуре 21–23 °С, влажности 38–50%, со свободным доступом к корму и воде.

Ротенон-индуцированная ретиальная дегенерация

Для индукции ретиальной дегенерации 18 самцам крыс (возраст 20 недель, масса 250–275 г) под местной новокаиновой анестезией интравитреально инъецировали 5 мкл 0,4 мМ раствора ротенона, разбавленного 5%-м раствором ДМСО в PBS Дюльбекко (D-PBS) (2 нмоль/глаз) [17].

Затем животных делили на три равные группы:

- 1) контроль (стерильная вода подкожно + ротенон интраорбитально);
- 2) pHBSF (pHBSF 5 мкг/кг подкожно + ротенон интраорбитально);
- 3) EPO (EPO 10 мкг/кг подкожно + ротенон интраорбитально).

Дополнительно была введена группа интактных животных (n = 6; соответствующие по возрасту и массе) с введением носителя вместо ротенона.

Исследуемые препараты EPO и pHBSF вводили подкожно за 30 мин до инъекции ротенона. Животным контрольной и интактной групп вводили стерильную воду. На 3-й день глаза энуклеировали для гистологического исследования и анализа экспрессии целевых генов (рис. 1).

Морфологическое исследование

Глазные яблоки заливали в парафин с предварительной фиксацией в забуференном формалине (pH около 7,0) с 0,002%-м раствором пикриновой кислоты и с последующей осторожной аспирацией стекловидного тела и заменой расплавленным воском, как описано ранее [18]. Все срезы были стандартизированы по одной и той же области (1 мм выше слепого пятна) и толщине (7 мкм) для корректного сравнения полученных данных. Слайды окрашивали по стандартным протоколам [19] для

дальнейшего структурного анализа. Проводили оценку толщины слоя внутреннего плексиформного слоя (ВПС) и числа ядер на 100 мкм слоя ганглионарных клеток.

Количественная полимеразно-цепная реакция

Выделение суммарной РНК и обратную транскрипцию проводили по методике, описанной ранее [20]. Для оценки экспрессии целевых генов в амплификаторе CFX96 (BioRad; США) проводили ПЦР образцов с использованием коммерческого набора SYBR® Green Master Mix (Bio-Rad Laboratories, Inc.; США) и олигонуклеотидных праймеров (Евроген; Россия).

Праймеры подбирали с использованием ресурса Primer-BLAST (NCBI) и с соблюдением ряда условий: 1) температура плавления 59–61 °С; 2) каждый праймер должен отжигаться на область межэкзонного соединения или оба праймера должны отжигаться на разные экзоны; 3) прямой и обратный праймеры не должны образовывать ауто- и кросс-димеры в одной смеси; 4) размер ПЦР-продукта должен составлять 95–107 п.н. (см. таблицу).

Преобразование полученных при количественной ПЦР данных проводили с использованием метода двух дельта. После проведения амплификации с помощью программы Bio-Rad CFX Manager (Bio-Rad; США) для каждого образца рассчитывали ΔC_t (разницу между пороговым значением цикла для гена домашнего хозяйства и пороговым значением цикла для гена интереса).

Полученные данные преобразовывали по формуле (1) [21]:

$$2E \Delta \Delta C_t = \Delta C_t - \Delta C_{t_{\text{контр}}} \quad (1),$$

где ΔC_t — цикл, в котором логарифмическая кривая интенсивности флуоресценции красителя SYBR Green достигает порогового уровня (cycle threshold) при проведении реакции с геном домашнего хозяйства, взятым как контроль; $\Delta C_{t_{\text{контр}}}$ — разница циклов между пороговым уровнем флуоресценции для гена интереса и контрольным геном.

Исследование цитопротективной активности рНБСП при ротеноновой токсичности *in vitro*

Для приготовления культуры клеток использовали мышей линии CD1 в возрасте одной недели после рождения. Проводили декапитацию животного, помещали голову на чашку Петри, помещенную на лед. Препарирование черепной коробки от кожи и фасций проводили в условиях охлаждения. Извлекали головной мозг и помещали в чашку Петри с охлажденным PBS. Гиппокамп, кору или средний отдел мозга выделяли под бинокляром Leica (ув. $\times 10$) на охлажденном предметном стекле, помещенном в чашку Петри.

Ткани собирали в пробирку, промывали D-PBS, трипсинизировали, и засеивали по 20 000 клеток в планшеты, обработанные поли-D-лизин, для дальнейшего культивирования в среде Neurobasal (Ганэко; Россия). Через 16–18 ч половину среды заменяли на среду Neurobasal Plus. Через каждые 2 дня проводили контроль культуры под микроскопом и меняли половину среды на новую. Культивирование клеток осуществляли в течение 10 дней. За 24 ч до подсчета числа живых клеток в лунки добавляли ротенон для получения конечной концентрации 2,5 мМ. После 20 ч инкубации с ротеноном в суспензию добавляли изучаемые препараты (рНБСП и EPO) в концентрациях 50 или 500 нМ. Подсчет выживших клеток проводили с помощью окраски красителем MTT [3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид] в автоматическом счетчике клеток с функцией анализатора жизнеспособности Cell Counter (Corning; США) с использованием программы CytoSmart (Axion; Нидерланды).

Статистическая обработка

Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка. Нормально распределенные данные представляли в виде $M \pm SD$, ненормально распределенные данные — в виде $Me [Q_1; Q_3]$. Статистическую обработку и визуализацию данных проводили в программе GraphPad Prism 9.2.0 (Graphpad Software Inc; США). Значимость различий определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа Краскела–Уоллиса и анализа *post hoc* по методу Данна с процедурой Бенджамини–Хохберга. Данные, использованные для построения тепловых карт, не подвергали статистической обработке.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование продемонстрировало, что интравитреальные инъекции ротенона привели к специфическим изменениям морфологии сетчатки: ее истончению, уменьшению толщины ВПС и уменьшению количества ганглионарных клеток. Толщина ВПС уменьшилась с 41,92 мкм [38,74; 43,70] в группе носителя до 23,59 мкм [21,37; 25,62] в группе с введением ротенона, тогда как количество ядер в 100 мкм слоя ганглионарных клеток (СГК) уменьшилось с 8,22 [7,75; 8,83] до 4,78 [4,42; 4,67]. Изменения указывают на дегенерацию ганглионарных клеток, что свидетельствует о нейродегенеративном процессе, индуцированном ротеноном. Кроме того, анализ экспрессии генов выявил повышенную экспрессию цитокинов *Il6* и *Il1b* и снижение экспрессии *Nefl*, маркера количества ганглионарных клеток сетчатки (ГКС), что также подтверждает повреждение сетчатки.

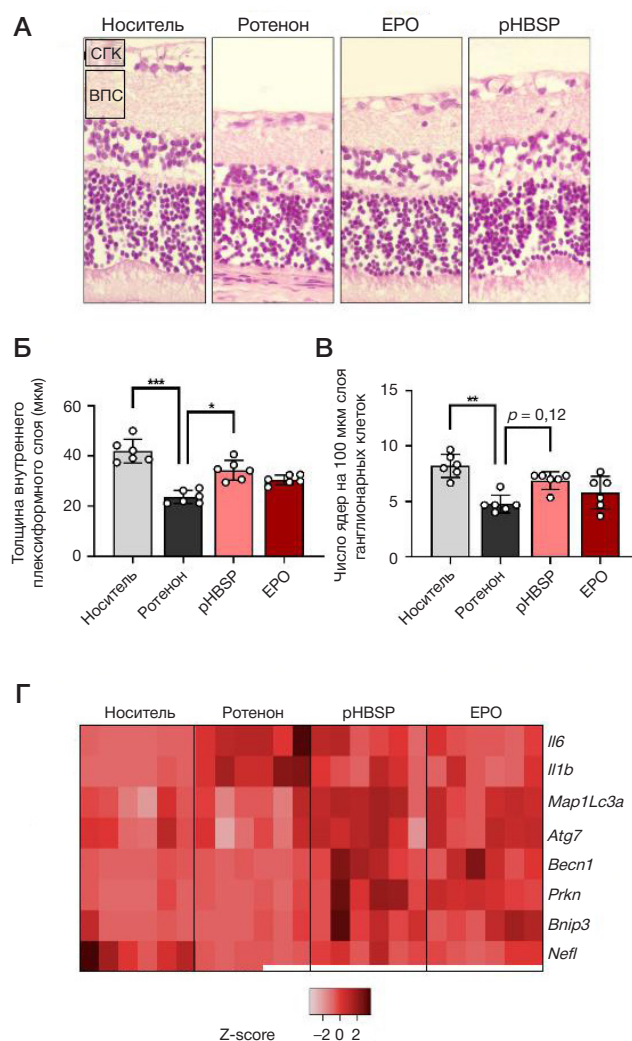


Рис. 2. Терапевтический эффект рНБСП и EPO на ротеноно-индуцированную ретинопатию у крыс. **А.** Репрезентативные снимки гистологических срезов сетчатки. **Б.** Результаты оценки толщины внутреннего плексиформного слоя. **В.** Результаты подсчета числа ядер в ганглионарном слое сетчатки. **Г.** Нормализованная тепловая карта, отражающая экспрессию маркеров воспаления (*Il6*, *Il1b*), аутофагии (*Map1Lc3a*, *Atg7*), митохондриальной дегенерации (*Becn1*, *Prkn*, *Bnip3*) и ретикулярной дегенерации (*Nefl*). СГК — слой ганглионарных клеток; ВПС — внутренний плексиформный слой; * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,005$; *** — $p < 0,0005$ при сравнении результатов анализа по Краскелу–Уоллису и *post-hoc* анализа по Данну.

рНБСП и EPO значительно уменьшили изменения, вызванные ротеноном, как по гистологической картине (рис. 2А–В), так и по данным анализа экспрессии генов (рис. 2Г). Примечательно, что рНБСП продемонстрировал более значительное снижение дегенерации сетчатки. Толщина ВПС и число ядер в 100 мкм СГК у крыс, получавших рНБСП, составляли 34,34 [31,52; 36,02] и 6,89 [7,00; 7,33] соответственно.

Обнаружено также, что крысы, получавшие рНБСП или EPO, имели повышенную экспрессию маркеров митохондриальной дегенерации и аутофагии *Map1Lc3a*, *Atg7*, *Becn1*, *Prkn*, *Bnip3* в сетчатке (рис. 2Г). Оба препарата продемонстрировали сравнимую активность в отношении повышения экспрессии *Nefl* и генов, которые кодируют белки, связанные с аутофагией, а также сравнимую супрессорную активность в отношении экспрессии провоспалительных цитокинов.

Таким образом, однократное системное введение рНБСП и EPO в дозах 5 и 10 мкг соответственно привело к снижению ретикулярной дегенерации, вызванной интравитреальной инъекцией ротенона. В основе

ретинопротективных эффектов, опосредованных стимуляцией EPOR/CD131, может лежать снижение воспалительной активации и усиление митофагии, что подтверждено снижением экспрессии маркеров воспаления и увеличением экспрессии маркеров ауто/митофагии.

Цитопротективная активность *in vitro*

Инкубация в течение 24 ч первичной нейроглиальной культуры гиппокампа в 2,5 мкМ растворе ротенона привела к гибели более 50% культуры, что снизило количество живых клеток с $69,80 \pm 6,62\%$ в группе необработанных клеток до $27,06 \pm 8,98\%$ в группе с применением ротенона без лечения (рис. 3). Применение исследуемых препаратов в концентрации 500 нМ статистически значимо увеличило жизнеспособность культуры до $61,73 \pm 11,56\%$ ($p < 0,005$) и $71,20 \pm 6,97\%$ ($p < 0,005$) при применении pHBSF и EPO соответственно. В концентрации 50 нМ оба препарата так же выраженно снизили количество мертвых клеток, но эффект не был статистически значим.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Функциональное состояние митохондрий рассматривают как один из основных факторов, определяющих клеточный гомеостаз. Ткани с особенно большими энергетическими потребностями, такие как мозг и сетчатка, характеризуются наиболее высокой чувствительностью к митохондриальным аномалиям [2].

В данном исследовании мы продемонстрировали, что стимуляция EPOR/CD131 способна улучшать морфофункциональное состояние нейрональных клеток сетчатки и выживаемость первичной нейроглиальной культуры *in vitro* при химически индуцированной митохондриальной дисфункции. Поскольку нейротоксичный эффект ротенона связан с разобщением дыхательной цепи митохондрий, митопротективное действие можно рассматривать как наиболее вероятный механизм наблюдаемых положительных эффектов стимуляции EPOR/CD131. В целом это согласуется с полученными ранее данными, касающимися влияния EPO на митохондриальную функцию [22]. Анализ генной экспрессии продемонстрировал, что одним из потенциальных механизмов митопротективной активности агонистов EPOR/CD131 является стимуляция ауто- и митофагии. Так, применение препаратов привело к увеличению экспрессии мРНК LC3A, ATG7, Beclin-1, Паркина и BNIP3. Эти результаты согласуются также с полученными нами ранее данными по эффекту pHBSF на экспрессию генов аутофагии при этанол-индуцированной нейродегенерации

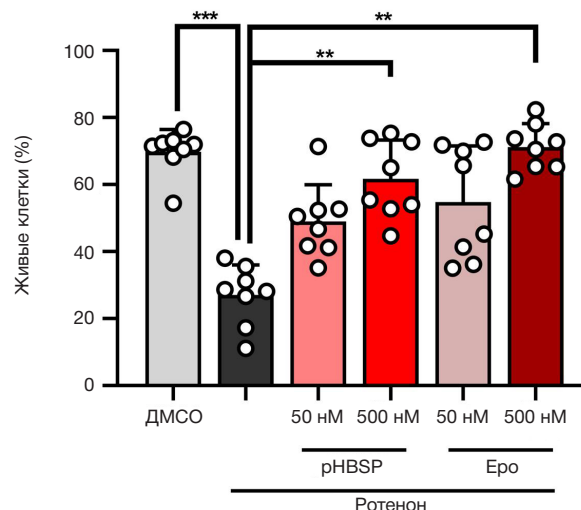


Рис. 3. Цитопротективное действие pHBSF и EPO на первичной нейроглиальной культуре, обработанной ротеноном в концентрации 2,5 М. ** — $p < 0,005$; *** — $p < 0,0005$ при сравнении по Данну

у крыс [23]. Несмотря на то что в этой работе мы не проводили количественную или полуколичественную оценку уровня степени фосфорилирования белков аутофагии, некоторые из данных факторов уже были идентифицированы как медиаторы нейропротекции при митохондриальной дисфункции [16, 24, 25]. Кроме того, прежде было показано, что некоторые положительные эффекты pHBSF связаны со стимуляцией аутофагии. Например, продемонстрировано, что гепатопротективная активность pHBSF связана с увеличением экспрессии белков LC3II, LC3I, and Beclin 1 и может быть отменена ингибиторами аутофагии [15]. Аналогично, аутофагия была идентифицирована как одно из основных звеньев, опосредующих нейропротективные эффекты EPO [26].

ВЫВОДЫ

Таким образом, EPO и pHBSF, селективный агонист EPOR/CD131, проявляют выраженную нейропротективную активность при ротенон-индуцированном поражении. Исследование показало, что стимуляция аутофагии и митофагии является одним из вероятных механизмов наблюдаемых фармакологических эффектов. Применение агонистов EPOR/CD131 является перспективным направлением в лечении нейродегенеративных процессов центральной нервной системы и сетчатки. Дальнейшие исследования на конкретных моделях НЗ, таких как болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера или боковой амиотрофический склероз, могут помочь в определении перспективности клинического применения pHBSF.

Литература

- Logroscino G, Urso D, Savica R. Descriptive epidemiology of neurodegenerative diseases: What are the critical questions? *Neuroepidemiology*. 2022 Jun 21. Online ahead of print. PMID: 35728570.
- Soldatov VO, Kukharsky MS, Belykh AE, Sobolev AM, Deykin AV. Retinal Damage in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Underlying Mechanisms. *Eye Brain*. 2021; 13: 131–146. PMID: 34012311.
- Angelova PR, Esteras N, Abramov AY. Mitochondria and lipid peroxidation in the mechanism of neurodegeneration: Finding ways for prevention. *Med Res Rev*. 2021; 41 (2): 770–784. PMID: 32656815.
- Ludtmann MHR, Abramov AY. Mitochondrial calcium imbalance in Parkinson's disease. *Neurosci Lett*. 2018; 663: 86–90. PMID: 28838811.
- Lou G, Palikaras K, Lautrup S, Scheibye-Knudsen M, Tavernarakis N, Fang EF. Mitophagy and Neuroprotection. *Trends Mol Med*. 2020; 26 (1): 8–20. PMID: 31375365.
- Lemasters JJ. Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Rejuvenation Res*. 2005; 8 (1): 3–5. doi:

- 10.1089/rej.2005.8.3.
7. Palikaras K, Lionaki E, Tavernarakis N. Mechanisms of mitophagy in cellular homeostasis, physiology and pathology. *Nat. Cell Biol.* 2018; 20 (9): 1013–1022. doi: 10.1038/s41556-018-0176-2.
8. Zuo Z, Jing K, Wu H, Wang S, Ye L, Li Z, Yang C, Pan Q, Liu WJ, Liu HF. Mechanisms and Functions of Mitophagy and Potential Roles in Renal Disease. *Front Physiol.* 2020; 11: 935. PMID: 32903665.
9. Moreau K, Luo S, Rubinsztein DC. Cytoprotective roles for autophagy. *Curr Opin Cell Biol.* 2010; 22 (2): 206–211. PMID: 20045304.
10. Cai Q, Ganesan D. Regulation of neuronal autophagy and the implications in neurodegenerative diseases. *Neurobiol Dis.* 2022; 162: 105582. PMID: 34890791.
11. Senousy MA, Hanafy ME, Shehata N, Rizk SM. Erythropoietin and Bacillus Calmette-Guérin Vaccination Mitigate 3-Nitropropionic Acid-Induced Huntington-like Disease in Rats by Modulating the PI3K/Akt/mTOR/P70S6K Pathway and Enhancing the Autophagy. *ACS Chem Neurosci.* 2022; 13(6): 721–732. PMID: 35226456.
12. Nichol A, French C, Little L, Haddad S, Presneill J, Arabi Y, Bailey M, Cooper DJ, Duranteau J, Huet O, Mak A, McArthur C, Pettilä V, Skrifvars M, Vallance S, Varma D, Wills J, Bellomo R. EPO-TBI Investigators; ANZICS Clinical Trials Group. Erythropoietin in traumatic brain injury (EPO-TBI): a double-blind randomised controlled trial. *Lancet.* 2015; 386 (10012): 2499–2506. PMID: 26452709.
13. Hemani S, Lane O, Agarwal S, Yu SP, Woodbury A. Systematic Review of Erythropoietin (EPO) for Neuroprotection in Human Studies. *Neurochem Res.* 2021; 46(4): 732–739. PMID: 33521906.
14. Robertson CS, Garcia R, Gaddam SS, Grill RJ, Cerami Hand C, Tian TS, Hannay HJ. Treatment of mild traumatic brain injury with an erythropoietin-mimetic peptide. *J Neurotrauma.* 2013; 30 (9): 765–74. PMID: 22827443.
15. Tan R, Tian H, Yang B, Zhang Bo, Dai C, Han Z, Wang M, Li Y, Wei L, Chen D, Wang G, Yang H, He F, Chen Z. Autophagy and Akt in the protective effect of erythropoietin helix B surface peptide against hepatic ischaemia/reperfusion injury in mice. *Sci Rep.* 2018; 8 (1): 14703.
16. Filomeni G, Graziani I, De Zio D, Dini L, Centonze D, Rotilio G, Ciriolo MR. Neuroprotection of kaempferol by autophagy in models of rotenone-mediated acute toxicity: possible implications for Parkinson's disease. *Neurobiol Aging.* 2012; 33 (4): 767–85. PMID: 20594614.
17. Sasaoka M, Ota T, Kageyama M. Rotenone-induced inner retinal degeneration via presynaptic activation of voltage-dependent sodium and L-type calcium channels in rats. *Sci Rep.* 2020; 10: 969. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57638-y>.
18. Benjamin AB, Ahenkorah J, Bismarck AH, Esther D, Addai FK. Improved method of producing satisfactory sections of whole eyeball by routine histology. *Microscopy Research and Technique.* 2014; 77 (2): 138–142. PMID: 24249388.
19. Goldberg MF, McLeod S, Tso M, Packo K, Edwards M, Bhutto IA, Baldeosingh, Eberhart C, Weber BHF, Luty GA. Ocular Histopathology and Immunohistochemical Analysis in the Oldest Known Individual with Autosomal Dominant Vitreoretinopathy. *Ophthalmology Retina.* 2018; 2 (4): 360–378. PMID: 29774302.
20. Kubekina MV, Silaeva YY, Bruter AV, Korshunova DS, Ilchuk LA, Okulova YD, Soldatova MO, Seryogina E, Kolesnik IM, Ukolova PA, Korokin MV, Deykin AV. Transgenic mice Cre-dependently expressing mutant polymerase-gamma: novel test-system for pharmacological study of mitoprotective drugs. *Research Results in Pharmacology.* 2021; 7 (3): 33–39.
21. Livak KJ. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001; 25 (4): 402–408. PMID: 11846609.
22. Plenge U, Belhage B, Guadalupe-Grau A, Andersen PR, Lundby C, Dela F, Stride N, Pott FC, Helge JW, Boushel R. Erythropoietin treatment enhances muscle mitochondrial capacity in humans. *Front Physiol.* 2012; 13 (3): 50. PMID: 22419911.
23. Покровский М. В., Солдатов В. О., Затолокина М. А. и др. Связь EPOR/CD131-опосредованной нейропротекции при хронической экспозиции этанола у крыс с модуляцией экспрессии генов аутофагии, апоптоза, нейровоспаления и нейрональной регенерации. *Экспериментальная и клиническая фармакология.* 2021; 84 (2): 91–98.
24. Su Y, Zhang Z, Li H, Ma J, Sun L, Shao S, Zhang Z, Hölscher C. A GLP-2 Analogue Protects SH-SY5Y and Neuro-2a Cells Against Mitochondrial Damage, Autophagy Impairments and Apoptosis in a Parkinson Model. *Drug Res (Stuttg).* 2021; 71 (1): 43–50. PMID: 33022720.
25. Li Q, Zhang T, Wang J, Zhang Z, Zhai Y, Yang GY, Sun X. Rapamycin attenuates mitochondrial dysfunction via activation of mitophagy in experimental ischemic stroke. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014; 444 (2): 182–188. PMID: 24440703.
26. Jang W, Kim HJ, Li H, Jo KD, Lee MK, Yang HO. The Neuroprotective Effect of Erythropoietin on Rotenone-Induced Neurotoxicity in SH-SY5Y Cells Through the Induction of Autophagy. *Mol Neurobiol.* 2016; 53 (6): 3812–3821. PMID: 26156288.

References

1. Logroscino G, Urso D, Savica R. Descriptive epidemiology of neurodegenerative diseases: What are the critical questions? *Neuroepidemiology.* 2022 Jun 21. Online ahead of print. PMID: 35728570.
2. Soldatov VO, Kukharsky MS, Belykh AE, Sobolev AM, Deykin AV. Retinal Damage in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Underlying Mechanisms. *Eye Brain.* 2021; 13: 131–146. PMID: 34012311.
3. Angelova PR, Esteras N, Abramov AY. Mitochondria and lipid peroxidation in the mechanism of neurodegeneration: Finding ways for prevention. *Med Res Rev.* 2021; 41 (2): 770–784. PMID: 32656815.
4. Ludtmann MHR, Abramov AY. Mitochondrial calcium imbalance in Parkinson's disease. *Neurosci Lett.* 2018; 663: 86–90. PMID: 28838811.
5. Lou G, Palikaras K, Lautrup S, Scheibye-Knudsen M, Tavernarakis N, Fang EF. Mitophagy and Neuroprotection. *Trends Mol Med.* 2020; 26 (1): 8–20. PMID: 31375365.
6. Lemasters JJ. Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Rejuvenation Res.* 2005; 8 (1): 3–5. doi: 10.1089/rej.2005.8.3.
7. Palikaras K, Lionaki E, Tavernarakis N. Mechanisms of mitophagy in cellular homeostasis, physiology and pathology. *Nat. Cell Biol.* 2018; 20 (9): 1013–1022. doi: 10.1038/s41556-018-0176-2.
8. Zuo Z, Jing K, Wu H, Wang S, Ye L, Li Z, Yang C, Pan Q, Liu WJ, Liu HF. Mechanisms and Functions of Mitophagy and Potential Roles in Renal Disease. *Front Physiol.* 2020; 11: 935. PMID: 32903665.
9. Moreau K, Luo S, Rubinsztein DC. Cytoprotective roles for autophagy. *Curr Opin Cell Biol.* 2010; 22 (2): 206–211. PMID: 20045304.
10. Cai Q, Ganesan D. Regulation of neuronal autophagy and the implications in neurodegenerative diseases. *Neurobiol Dis.* 2022; 162: 105582. PMID: 34890791.
11. Senousy MA, Hanafy ME, Shehata N, Rizk SM. Erythropoietin and Bacillus Calmette-Guérin Vaccination Mitigate 3-Nitropropionic Acid-Induced Huntington-like Disease in Rats by Modulating the PI3K/Akt/mTOR/P70S6K Pathway and Enhancing the Autophagy. *ACS Chem Neurosci.* 2022; 13(6): 721–732. PMID: 35226456.
12. Nichol A, French C, Little L, Haddad S, Presneill J, Arabi Y, Bailey M, Cooper DJ, Duranteau J, Huet O, Mak A, McArthur C, Pettilä V, Skrifvars M, Vallance S, Varma D, Wills J, Bellomo R. EPO-TBI Investigators; ANZICS Clinical Trials Group. Erythropoietin in traumatic brain injury (EPO-TBI): a double-blind randomised controlled trial. *Lancet.* 2015; 386 (10012): 2499–2506. PMID: 26452709.
13. Hemani S, Lane O, Agarwal S, Yu SP, Woodbury A. Systematic

- Review of Erythropoietin (EPO) for Neuroprotection in Human Studies. *Neurochem Res.* 2021; 46 (4): 732–739. PMID: 33521906.
14. Robertson CS, Garcia R, Gaddam SS, Grill RJ, Cerami Hand C, Tian TS, Hannay HJ. Treatment of mild traumatic brain injury with an erythropoietin-mimetic peptide. *J Neurotrauma.* 2013; 30 (9): 765–74. PMID: 22827443.
 15. Tan R, Tian H, Yang B, Zhang Bo, Dai C, Han Z, Wang M, Li Y, Wei L, Chen D, Wang G, Yang H, He F, Chen Z. Autophagy and Akt in the protective effect of erythropoietin helix B surface peptide against hepatic ischaemia/reperfusion injury in mice. *Sci Rep.* 2018; 8 (1): 14703.
 16. Filomeni G, Graziani I, De Zio D, Dini L, Centonze D, Rotilio G, Ciriolo MR. Neuroprotection of kaempferol by autophagy in models of rotenone-mediated acute toxicity: possible implications for Parkinson's disease. *Neurobiol Aging.* 2012; 33 (4): 767–85. PMID: 20594614.
 17. Sasaoka M, Ota T, Kageyama M. Rotenone-induced inner retinal degeneration via presynaptic activation of voltage-dependent sodium and L-type calcium channels in rats. *Sci Rep.* 2020; 10: 969. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57638-y>.
 18. Benjamin AB, Ahenkorah J, Bismarck AH, Esther D, Addai FK. Improved method of producing satisfactory sections of whole eyeball by routine histology. *Microscopy Research and Technique.* 2014; 77 (2): 138–142. PMID: 24249388.
 19. Goldberg MF, McLeod S, Tso M, Packo K, Edwards M, Bhutto IA, Baldeosingh, Eberhart C, Weber BHF, Luty GA. Ocular Histopathology and Immunohistochemical Analysis in the Oldest Known Individual with Autosomal Dominant Vitreoretinopathy. *Ophthalmology Retina.* 2018; 2 (4): 360–378. PMID: 29774302.
 20. Kubekina MV, Silaeva YY, Bruter AV, Korshunova DS, Ilchuk LA, Okulova YD, Soldatova MO, Seryogina E, Kolesnik IM, Ukolova PA, Korokin MV, Deykin AV. Transgenic mice Cre-dependently expressing mutant polymerase-gamma: novel test-system for pharmacological study of mitoprotective drugs. *Research Results in Pharmacology.* 2021; 7 (3): 33–39.
 21. Livak KJ. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001; 25 (4): 402–408. PMID: 11846609.
 22. Plenge U, Belhage B, Guadalupe-Grau A, Andersen PR, Lundby C, Dela F, Stride N, Pott FC, Helge JW, Boushel R. Erythropoietin treatment enhances muscle mitochondrial capacity in humans. *Front Physiol.* 2012; 13 (3): 50. PMID: 22419911.
 23. Pokrovskij MV, Soldatov VO, Zatolokina MA et al. Svjaz' EPOR/CD131-oposredovanoj nevroprotekcii pri hronicheskoj jekspozicii jetanola u krysa s moduljaciej jekspressii genov autofagii, apoptoza, nevrovspaleniya i nejronal'noj regeneracii. *Jeksperimental'naja i klinicheskaja farmakologija.* 2021; 84 (2): 91–98. Russian].
 24. Su Y, Zhang Z, Li H, Ma J, Sun L, Shao S, Zhang Z, Hölscher C. A GLP-2 Analogue Protects SH-SY5Y and Neuro-2a Cells Against Mitochondrial Damage, Autophagy Impairments and Apoptosis in a Parkinson Model. *Drug Res (Stuttg).* 2021; 71 (1): 43–50. PMID: 33022720.
 25. Li Q, Zhang T, Wang J, Zhang Z, Zhai Y, Yang GY, Sun X. Rapamycin attenuates mitochondrial dysfunction via activation of mitophagy in experimental ischemic stroke. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014; 444 (2) :182–188. PMID: 24440703.
 26. Jang W, Kim HJ, Li H, Jo KD, Lee MK, Yang HO. The Neuroprotective Effect of Erythropoietin on Rotenone-Induced Neurotoxicity in SH-SY5Y Cells Through the Induction of Autophagy. *Mol Neurobiol.* 2016; 53 (6): 3812–3821. PMID: 26156288.

ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФТОРИД-ИОНОВ В РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ ПРИ ОСТРОМ ПЕРИКОРОНИТЕ

В. Д. Вагнер¹, Е. А. Сарф², Л. В. Бельская², А. С. Коршунов³✉, К. Н. Курятников³, А. А. Бондарь³, А. Д. Мелоян³, К. А. Максименко³, М. Н. Касий³

¹ Центральный научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии, Москва, Россия

² Омский государственный педагогический университет, Омск, Россия

³ Омский государственный медицинский университет, Омск, Россия

Разработка новых методов ранней диагностики и исхода стоматологических заболеваний по концентрации различных ионов в ротовой жидкости является перспективным направлением. По составу ротовой жидкости можно оценивать состояние не только стоматологического здоровья, но и всего организма в целом. Превышение концентрации фторид-ионов оказывает негативное влияние на органы и ткани полости рта, а контроль за его поступлением в организм врачами не проводится. Целью исследования было разработать и апробировать методику определения фторид-ионов в ротовой жидкости методом капиллярного электрофореза при стоматологических заболеваниях. Получены данные о концентрации фторид-ионов в норме ($2,16 \pm 0,48$ мг/л), при множественном кариесе и остром перикороните ($18,9 \pm 4,2$ мг/л), остром перикороните ($15,2 \pm 2,7$ мг/л). На третьи сутки после оперативного вмешательства значения в группе с острым перикоронитом пришли в норму ($2,28 \pm 0,52$ мг/л), при множественном кариесе и остром перикороните, даже после хирургического вмешательства, остались высокими ($8,7 \pm 1,9$ мг/л; $p < 0,0001$). Разработанная методика эффективна для изучения концентрации фторид-ионов при изолированных и сочетанных стоматологических заболеваниях.

Ключевые слова: перикоронит, множественный кариес, фториды, ротовая жидкость, капиллярный электрофорез

Вклад авторов: В. Д. Вагнер — планирование исследования, анализ литературы, интерпретация данных; Е. А. Сарф — проведение биохимических исследований, статистическая обработка данных; Л. В. Бельская — планирование исследования, проведение биохимических исследований, подготовка рукописи; А. С. Коршунов — планирование исследования, анализ литературы, интерпретация данных, набор клинического материала, подготовка рукописи; К. Н. Курятников — набор клинического материала, интерпретация данных, подготовка рукописи; А. А. Бондарь, А. Д. Мелоян, К. А. Максименко, М. Н. Касий — подготовка образцов для исследования, анализ данных.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО ОмГМУ Министерства здравоохранения РФ (протокол № 113 от 26 ноября 2019 г.); все участники исследования или их представители подписали добровольное информированное согласие.

✉ **Для корреспонденции:** Андрей Сергеевич Коршунов
ул. Косарева, д. 34, г. Омск, 644043, Россия; andrey_k_180588@mail.ru

Статья получена: 12.08.2022 **Статья принята к печати:** 26.08.2022 **Опубликована онлайн:** 28.08.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.042

PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF ORAL FLUID FLUORIDE MEASUREMENT IN ACUTE PERICORONITIS

Vagner VD¹, Sarf EA², Belskaya LV², Korshunov AS³✉, Kuryatnikov KN³, Bondar AA³, Meloyan AD³, Maksimenko KA³, Kasiy MN³

¹ Central Research Institute of Dentistry and Maxillofacial Surgery, Moscow, Russia

² Omsk State Pedagogical University, Omsk, Russia

³ Omsk State Medical University, Omsk, Russia

Oral fluid is a valuable substrate for assessing dental health and other aspects of physical status. New methods for early diagnosis and prognosis of dental diseases on the basis of oral fluid composition are in constant demand. Excessive fluoride concentrations, often overlooked by dental therapists, negatively affect organs and tissues of the oral cavity. This study aimed at development and approbation of a method for reliable measurement of fluoride ions in oral fluid by capillary electrophoresis to be used in patients with dental diseases. The fluoride ion concentrations were measured in health (2.16 ± 0.48 mg/L), in isolated acute pericoronitis (15.2 ± 2.7 mg/L) and in acute pericoronitis combined to multiple caries (18.9 ± 4.2 mg/L). By post-operative day 3, fluoride levels in the group with isolated acute pericoronitis dropped to normal values (2.28 ± 0.52 mg/L), whereas in the group with acute pericoronitis combined to multiple caries fluoride levels remained high (8.7 ± 1.9 mg/L; $p < 0.0001$). The developed protocol is efficient for studying fluoride ion concentrations in isolated and combined dental diseases.

Keywords: pericoronitis, multiple caries, fluorides, oral fluid, capillary electrophoresis

Author contribution: Vagner VD — planning of the study, literature analysis, data interpretation; Sarf EA — biochemical research, statistical analysis; Belskaya LV — planning of the study, biochemical research, manuscript preparation; Korshunov AS — planning of the study, literature analysis, data interpretation, collection of clinical samples, manuscript preparation; Kuryatnikov KN — collection of clinical samples, data interpretation, manuscript preparation; Bondar AA, Meloyan AD, Maksimenko KA, Kasiy MN — sample preparation, data analysis.

Compliance with ethical standards: the study was approved by ethical review board of the Omsk State Medical University (Protocol № 113 of 26 November 2019); all participants or their representatives provided informed consent for participation in the study.

✉ **Correspondence should be addressed:** Andrey S. Korshunov
Kosareva, 34, Omsk, 644043, Russia; andrey_k_180588@mail.ru

Received: 12.08.2022 **Accepted:** 26.08.2022 **Published online:** 28.08.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.042

Проблему влияния фторидов на организм и здоровье человека изучают давно. В настоящее время отрицательное влияние фтора на организм доказывают ведущие ученые в области медицины, химии, гигиены труда и питания [1]. Известны эффекты фторидов на стоматологическое здоровье, они вызывают эндемические заболевания

(флюороз, кариес) при избыточном и недостаточном поступлении [2]. Фторид-ионы могут воздействовать на фосфоенолпируваткиназу и тем самым ингибировать гликолиз, в результате чего снижаются продукция молочной кислоты, развитие и размножение кариесогенной микрофлоры в полости рта. Действие фтора на другие

органы и ткани организма исследовано недостаточно [3]. Фториды ингибируют активность ферментов, кофакторами которых являются ионы марганца, кальция, железа и магния. Основными источниками фтора, попадающего в организм человека, служат питьевая вода, продукты питания, пыль, газообразные соединения фтора, поступающие через легкие при дыхании. Установлена среднесуточная потребность во фторидах (для взрослого человека 2–3 мг) [4]. До 70% фтора человек получает с питьевой водой и около 30% с пищей. Одно из важных значений фторидов — в профилактике развития кариеса зубов. Выявлена зависимость между содержанием фтора в организме и пораженностью людей флюорозом, в том числе с учетом тяжести течения эндемического процесса. Доказана взаимная зависимость кариеса и флюороза временных и постоянных зубов при различном содержании фтора в питьевой воде. Изучена интенсивность кариеса зубов, особенно у детей в зависимости от содержания фтора в питьевой воде [5].

Ключевые исследования в отечественной и зарубежной литературе затрагивают влияние фтора на течение и исход заболеваний твердых тканей зубов (кариес, флюороз). Мы не обнаружили публикаций об изменении интервальных значений фторид-ионов при затрудненном прорезывании зубов «мудрости». Изменение концентрации фторид-ионов при данных заболеваниях имеют важное практическое значение в силу прорезывания таких зубов в гипоминерализованном состоянии [6, 7]. Наличие воспалительного процесса при затрудненном прорезывании зубов «мудрости» негативно отражается на состоянии гомеостаза органов и тканей полости рта. Следовательно, повышение концентрации фторид-ионов до критических значений может иметь негативные последствия, особенно при наличии дополнительных очагов инфекции в полости рта.

В терапевтической стоматологии применяют препараты на основе фторидов, что является относительно недорогим и доступным методом лечения очаговой деминерализации эмали. Ионы фтора предотвращают кариес, влияют на метаболизм бактерий в зубном налете за счет ингибирования ферментативных процессов, тем самым уменьшают выработку кислот. Следовательно, уменьшается деминерализация кариозного поражения на ранних стадиях [8]. Однако простые фториды не могут предотвратить возникновение кариеса из-за кратковременности их нахождения на поверхности зуба и низкой концентрации выделяемого фтора. Применение малоэффективных простых фторидов в виде зубных паст, гелей, средств для полоскания, лаков для локального фторирования зубов — еще одна причина сохранения высокого уровня кариеса и некариозных поражений зубов. Зубные пасты и средства для полоскания, содержащие антимикробные компоненты, оказывают некоторое подавляющее воздействие на микробную биопленку, покрывающую поверхность зуба, однако они не обладают реминерализующим свойством [9]. Поэтому необходимо применение методов глубокого фторирования. Назначение препаратов фтора основывается только на стоматологическом статусе и не подкрепляется лабораторными исследованиями содержания фторид-ионов в организме. Важно учитывать, что фтор относится к микроэлементам, для которых характерен относительно резкий переход от физиологически полезных концентраций до концентраций, вызывающих токсикоз [10], именно поэтому определение фторидов в биологических

субстратах имеет важное диагностическое значение [11]. Индикатором содержания фторидов в организме является их наличие в крови, слюне, моче, костях, волосах [12].

Перспективной биологической жидкостью, отражающей общее состояние организма, является ротовая жидкость [13–15]. Благодаря возможности неинвазивного сбора и отсутствию риска инфицирования при получении биоматериала ротовая жидкость обладает очевидными преимуществами по сравнению с венозной или капиллярной кровью [16]. Состав ротовой жидкости адекватно отражает биохимический статус и физиологическое состояние человека [17]. Отсутствие унифицированного метода определения фторидов в биологических образцах затрудняет выбор надежного и воспроизводимого способа. Метод капиллярного электрофореза (КЭ) является одним из современных методов определения ионного состава различных объектов [18, 19]. Его совершенствование позволяет все более широко применять этот метод в различных областях аналитической химии [20]. Простота и доступность, а также неоспоримые преимущества, которые он дает при выполнении измерений, позволяют использовать его в повседневной лабораторной практике, а полученные результаты применять в различных областях медицины, в частности стоматологии для оценки тяжести и характера течения одонтогенных заболеваний.

На основании изученной литературы мы сочли целесообразным исследовать влияние стоматологических заболеваний на изменение концентрации фторид-ионов в ротовой жидкости. Повышение указанных ионов может нести негативные последствия для созревания и минерализации твердых тканей зубов человека или утяжелять течение заболеваний органов и тканей полости рта.

Цель исследования — разработка и апробация методики количественного определения фторидов в ротовой жидкости методом капиллярного электрофореза при множественном кариесе и остром перикороните.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Клиническое исследование

В контрольную группу были выбраны 200 людей с удовлетворительным уровнем гигиены полости рта и значением КПУ от 0 до 4,4 (среднее значение — $3,3 \pm 0,4$). Для апробации методики определения фторид-ионов в ротовой жидкости отобрали две исследованные группы: первая включала пациентов с острым перикоронитом на фоне множественного кариеса и значениями КПУ более 6,6 (среднее значение — $11,9 \pm 0,6$) (20 человек) в возрасте 20–25 лет. Во вторую группу отобрали пациентов с острым перикоронитом, удовлетворительным уровнем гигиены полости рта и значениями КПУ от 0 до 4,4 (среднее значение — $3,6 \pm 0,5$) (20 человек) в возрасте 20–25 лет. По результатам проведенного анкетирования установлены критерии включения: в контрольной группе — удовлетворительный уровень гигиены, КПУ — от 0 до 4,4, возраст — 20–25 лет; женский пол; в исследованной группе 1 — наличие острого перикоронита и множественного кариеса (КПУ более 6,6), возраст — 20–25 лет, женский пол; в исследованной группе 2 — наличие острого перикоронита, удовлетворительный уровень гигиены, КПУ от 0 до 4,4, возраст — 20–25 лет, женский пол. Критерии исключения: возраст менее 20 лет и более 25 лет, неудовлетворительный уровень гигиены, мужской пол, наличие хронических соматических,

Таблица 1. Характеристики электрофореграммы для определения фторид-ионов

№ градуировочного раствора	Время выхода, мин	Высота пика, mUA	Площадь пика	Концентрация, мг/л
Раствор 1	6,317	0,368	12,68	0,25
Раствор 2	6,323	2,398	64,32	1,0
Раствор 3	6,128	7,117	268,7	5,0
Раствор 4	6,048	9,299	504,2	10,0

воспалительных и инфекционных заболеваний, оказывающих негативное влияние на твердые ткани зубов и пародонт, наркотическая и алкогольная зависимость, прием ulcerогенных лекарственных препаратов. Обследование всех пациентов проводили на базе отделения стоматологии общей практики БУЗ Омской области «Городская клиническая стоматологическая поликлиника №1» в 2021–2022 гг. Пациенты исследованных групп были набраны во время приема врача-стоматолога после подтверждения диагноза.

У пациентов контрольной группы забор ротовой жидкости осуществляли натошак в стерильные пробирки для определения нормальных интервальных значений. В первой и второй исследованных группах забор ротовой жидкости проводили по аналогичной методике до проведения хирургического вмешательства (удаление зубов 38, 48, которые по результатам рентгенологического исследования находились на стадии полуретенции под слизистой оболочкой и капюшоном), на первые и третьи сутки по поводу острого перикоронита. Полученные образцы центрифугировали при 7000 об./мин. Определение концентрации фторид-ионов образцов ротовой жидкости проводили двумя методами: методом капиллярного электрофореза и фотометрическим методом.

Методика проведения капиллярного электрофореза

Разработку методики капиллярного электрофореза ротовой жидкости проводили с использованием системы капиллярного электрофореза КАПЕЛЬ-105М (Люмэкс; Россия) [21, 22]. Аппаратурное оформление и подготовка капилляра к работе описаны ранее [22]. Объем ротовой жидкости составил 100 мкл, проведено разбавление в 20 раз в дистиллированной воде. В отличие от приведенной ранее методики показано, что отсутствует необходимость предварительного осаждения белка [22]. Для определения анионов (хлориды, нитриты, нитраты, фосфаты, фториды, сульфаты) использовали ведущий электролит, содержащий CrO_3 (10 мМ), диэтаноламин (30 мМ) и цетилтриметиламмония гидроксид (2 мМ).

Методика фотометрического определения фторидов

В основе метода лежит определение изменения цвета циркон-ализаринового комплексного соединения в результате образования бесцветного более прочного комплексного соединения фторид-ионов с хлористым цирконием (IV) [23]. При реакции с фторидом циркон-ализариновый комплекс освобождает ализарин, который окрашивает раствор в желтый цвет. В мерную колбу вместимостью 100 см³ вносили 5 мкл ротовой жидкости, доводили объем пробы дистиллированной водой до метки, приливали 5 см³ раствора ализаринового красного С и 5 см³ кислого раствора хлористого циркония, приготовленных по ГОСТ 23268.18-78. Раствор тщательно перемешивали, выдерживали в течение часа при комнатной температуре и измеряли оптическую плотность на спектрофотометре

при длине волны 540 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм против холостой пробы.

Статистическая обработка данных

При статистической обработке экспериментальных данных проводили проверку характера распределения, подтвердили нормальное распределение, поэтому рассчитывали доверительные интервалы по критерию Стьюдента. Значения *p-value* приведены для уровня значимости 0,95.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработка методики определения фторидов методом капиллярного электрофореза

На первом этапе была проведена градуировка прибора. В табл. 1 представлены основные характеристики пика фторид-иона, рассчитанные исходя из полученных электрофореграмм градуировочных смесей. Для построения градуировочного графика использовали значение площади пика фторид-иона (рис. 1).

Поскольку в дальнейшем предполагалось определять фторид-ионы в ротовой жидкости, для построения градуировочного графика был использован раствор. В его состав входили все анионы, которые гипотетически могли быть обнаружены в слюне (рис. 2А). На рисунке на врезке показано изменение площади пика фторид-иона при изменении его концентрации в пробе.

При анализе проб ротовой жидкости не было обнаружено пиков нитрит- и нитрат-ионов (пики 2 и 4 соответственно). Типичная электрофореграмма для определения анионов слюны представлена на рис. 2Б. Для оценки сходимости результатов необходимо производить запись электрофореграммы одного образца в трех–четыре параллелях. Для того чтобы убедиться в правильной идентификации пика фторид-иона,

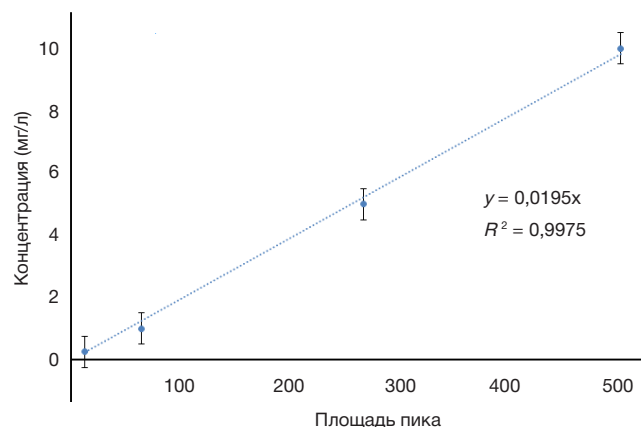


Рис. 1. Градуировочный график для анализа фторид-ионов (диапазон концентраций построения градуировочной зависимости для фторид-ионов составляет 0,1–10 мг/дм³)

проведено исследование методом «введено–найдено», согласно которому в образец с заранее определенным содержанием компонента вводят добавку с точно известной концентрацией (использовали государственный стандартный образец (ГСО) с концентрацией определяемых компонентов 1 мг/мл). Отмечено, что при введении добавок увеличиваются высота и площадь пика, идентифицируемого как фторид-ион (рис. 2Б). Установлено, что при введении добавки погрешность определения содержания фторид-ионов не превышает 10%.

Параллельно проведено определение в образцах фторид-ионов фотометрическим методом. Расчет концентрации фторид-ионов производили по предварительно построенному градуировочному графику (рис. 3). Следует отметить, что определение концентраций фторид-ионов возможно только в узком диапазоне при невысоких значениях. Это связано с тем, что при больших концентрациях зависимость оптической плотности от концентрации не является линейной. Поэтому аликвоты образца необходимо многократно разбавлять (табл. 2), что негативно сказывается на точности результатов измерения.

Показано, что значения концентраций фторид-ионов, определяемых методом капиллярного электрофореза и спектрофотометрическим методом, совпадают (табл. 2). Полученный результат позволяет говорить о равноценной возможности использования описанных методов. Однако, в связи с ограниченным диапазоном определяемых концентраций и сложностью разбавления, применение спектрофотометрического способа определения становится спорным. Так, при одинаковой аликвоте исследуемого образца методом капиллярного электрофореза концентрация фторид-ионов определяется во всех случаях, тогда как для применения спектрофотометрического метода необходимо подбирать условия разбавления, чтобы попасть в нужный диапазон концентраций (табл. 2). Содержание фторид-ионов у 200 добровольцев контрольной группы в среднем составило $2,27 \pm 1,07$ мг/л, но диапазон варьирования — от 0,16 до 8,7 мг/л, поэтому удобнее и целесообразнее использовать метод, при котором не требуется подбирать концентрацию фторид-ионов в пробе путем предварительного разбавления. В частности, метод капиллярного электрофореза удовлетворяет заявленным требованиям.

Апробация методики определения фторидов в ротовой жидкости при множественном кариесе и остром перикороните

Содержание фторидов в контрольной группе составляет $2,16 \pm 0,48$ мг/л. Полученные интервальные значения фторидов в ротовой жидкости, установленные методом капиллярного электрофореза, позволили нам использовать при оценке их изменчивости в исследованных группах, в которых наблюдается неблагоприятная клиническая ситуация в полости рта (зубы, пораженные кариозным процессом, острый перикоронит).

У пациентов исследованной группы 1 до хирургического вмешательства по поводу острого перикоронита отмечены максимально высокие значения содержания фторидов в ротовой жидкости ($18,9 \pm 4,2$ мг/л), в исследованной группе 2 показатели тоже высокие ($15,2 \pm 2,7$ мг/л).

На первые сутки после проведенного лечения отмечено достоверное снижение концентрации фторидов в исследованной группе 1 ($9,4 \pm 2,1$ мг/л) и исследованной группе 2 ($11,4 \pm 2,8$ мг/л).

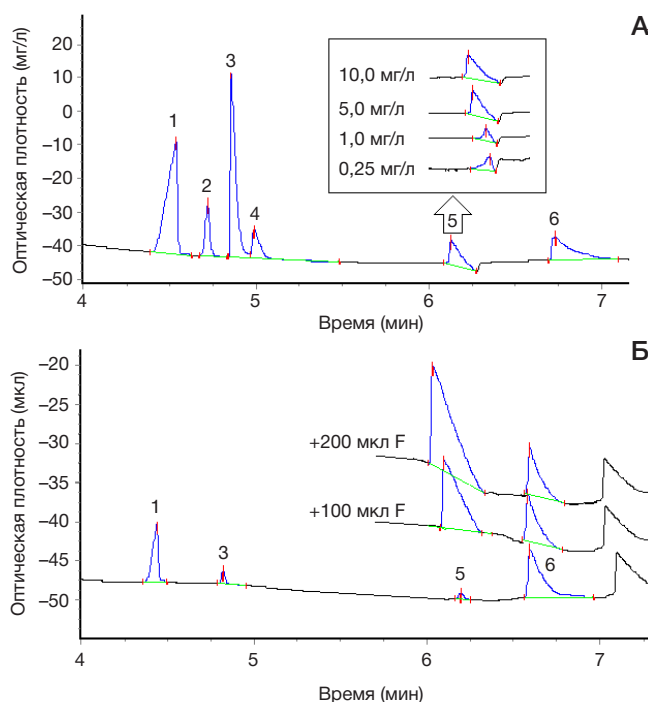


Рис. 2. А. Пример электрофореграммы градуировочного раствора для определения анионов (1 — хлориды, 2 — нитриты, 3 — сульфаты, 4 — нитраты, 5 — фториды, 6 — фосфаты). На врезке показаны пики фторид-ионов в диапазоне концентраций 0,25–10,0 мг/л. Б. Пример электрофореграммы слюны без добавок, а также при добавлении 100 и 200 мкл стандартного раствора фторид-ионов (разбавление в 20 раз)

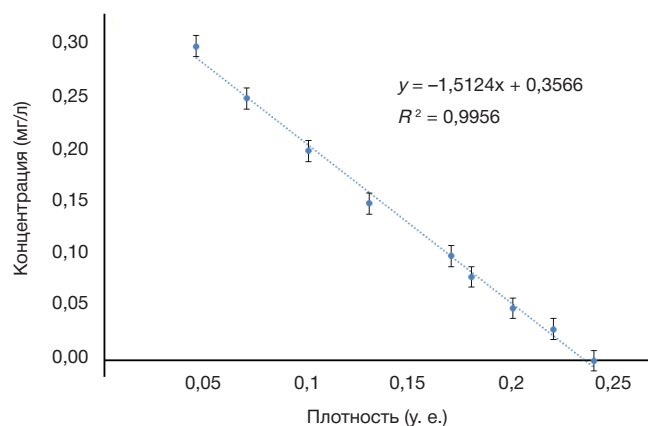


Рис. 3. Градуировочный график для фотометрического определения фторид-ионов

При сравнении содержания фторидов на третьи сутки после проведенного лечения в исследованной группе 1 происходит снижение показателей до интервальных значений контрольной группы ($2,16 \pm 0,48$ мг/л). В исследованной группе 2 показатели остались высокими ($8,7 \pm 1,9$ мг/л), что указывает на влияние множественного кариозного процесса и острого перикоронита на концентрацию фторидов в ротовой жидкости. Различия между исследуемыми группами статистически достоверны ($p < 0,0001$) (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ литературных данных по балансу фтора в организме показывает, что основное поступление фтора связано с пищей и водой; помимо этого возможно влияние факторов окружающей среды, а именно профессиональная интоксикация в производственных

Таблица 2. Пример определения концентрации фторид-ионов в слюне. КЭ (СЕ) — метод капиллярного электрофореза

Образец	КЭ, мг/л	Фотометрический метод, мг/л				Δ, %
		Без разбавления	Разбавление в 10 раз	Разбавление в 20 раз	Среднее содержание	
3	0,56	–	0,54	0,55	0,55	2,68
5	1,52	–	1,53	1,57	1,55	1,97
16	0,97	–	1,01	0,96	0,99	1,55
18	2,28	–	2,3	2,31	2,31	1,10
40	0,16	0,17	0,17	0,16	0,17	4,17
6	2,57	–	2,62	2,54	2,58	0,39
93	0,71	–	0,74	0,72	0,73	2,82
159	3,21	–	3,16	3,23	3,20	0,47
190	4,55	–	–	4,6	4,60	1,10
200	0,18	0,17	0,19	0,17	0,18	1,85

помещениях с высоким содержанием фтора в воздухе. Множество работ посвящены изучению содержания фтора в объектах окружающей среды [3, 4, 10]. Следует отметить, что в регионах и областях проживания людей содержание фтора в окружающей среде различается [11], соответственно норма содержания фторид-ионов в организме человека тоже будет варьировать в зависимости от региона проживания [24–26]. Многими авторами показана взаимосвязь различных системных заболеваний с содержанием фторид-ионов, но в большинстве случаев ее оценивали косвенно, по содержанию фторид-ионов в объектах окружающей среды [27]. Так, показано, что существует прямая корреляция между содержанием фтора в воде и заболеваемостью сахарным диабетом, ревматизмом, пиелонефритом, эрозией шейки матки, а также между отношением фтор/сульфаты в воде и цереброваскулярной болезнью, болезнями мочеполовой системы, женских половых органов, нервной системы и органов чувств [27]. Практически отсутствуют данные о взаимосвязи заболеваний с содержанием фторид-ионов в биологических жидкостях, в том числе и в ротовой жидкости. Накопление фтора происходит в зубах, особенно большое его количество обнаружено на поверхности эмали, поэтому определение фтора именно в слюне должно быть информативным. В нестимулированной слюне концентрация фторидов отражает сумму фторидов, присутствующих в протоковой слюне и поступающих из пищи и воды [28]. Заболевания полости рта, такие как кариес и флюороз, напрямую связаны с концентрацией фторид-

ионов. Поэтому своевременное определение и коррекция поступления фторид-ионов в организм имеют важное значение для оценки стоматологической заболеваемости. Описаны разные методы определения фторидов, что также усложняет сопоставление результатов, полученных разными авторами, при этом в разных методах и даже странах используют различные единицы измерения (мг/л, ммоль/л, ppm и др.) [11, 25, 29]. Для объектов окружающей среды используют капиллярный электрофорез, потенциометрический и фотометрические методы определения фторид-ионов. В целом, все перечисленные методы могут быть применены и для ротовой жидкости, однако в большинстве источников отсутствуют детальное описание, по которому можно воспроизвести методику, и подтверждение валидации метода [25]. Помимо описанных в настоящей работе встречается методика спектрофотометрического определения концентрации ионов фтора при 570 нм с использованием комплекса тринатрий 2-(4-сульфофенилазо)-1,8-дигидрокси-нафталин-3,6-дисульфата в качестве исходного комплекса и последующего его обесцвечивания за счет иона фтора [29]. Потенциометрические методы характеризуются большой погрешностью определения и необходимостью удаления мешающих примесей. Нами предложены методы, позволяющие определять фторид-ионы во всем диапазоне варьирования их содержания в слюне как фотометрически, так и с использованием капиллярного электрофореза. Следует отметить, что именно метод капиллярного электрофореза позволяет

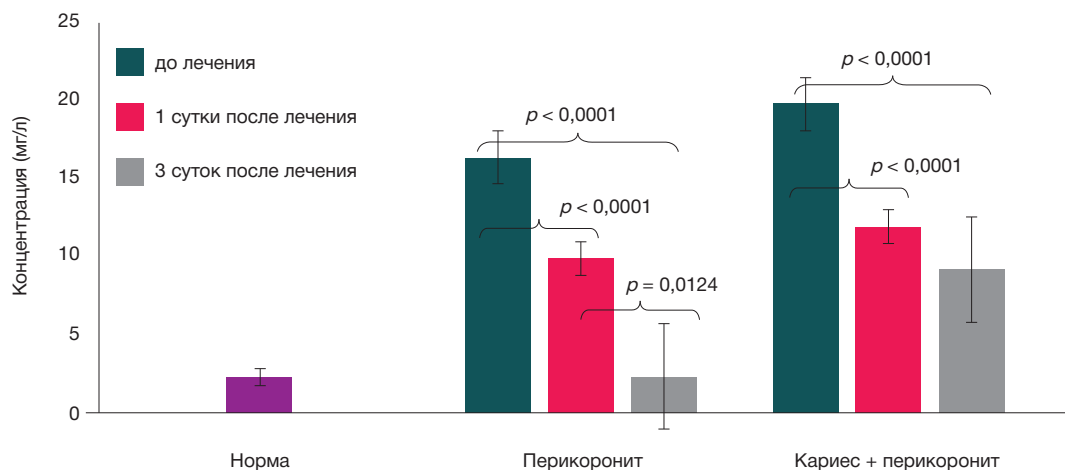


Рис. 4. Содержание фторидов в контрольной группе, исследованной группе 1, исследованной группе 2 до лечения, на 1-е сутки, 3-е сутки после хирургического лечения

одновременно с фторид-ионами определять содержание еще пяти анионов, важных с физиологической точки зрения (хлориды, нитраты, нитриты, сульфаты, фосфаты), что расширяет возможности его применения.

Вопросы исследования состава ротовой жидкости при фторировании эмали зубов достаточно широко освещены в литературе [2, 8, 9]. В основной массе исследований определяют соотношение Ca/P и не анализируют содержание фторидов в ротовой жидкости.

В исследованных группах нами выявлено максимально высокое содержание фторид-ионов в ротовой жидкости. В литературных источниках идет дискуссия относительно того, является ли прорезывание зубов локальным или системным процессом [30]. Изменение физико-химических показателей слюны, в том числе и содержания фторидов, позволяет предположить системный характер происходящих процессов. Поскольку зуб «мудрости» в момент сбора слюны уже почти прорезался, увеличение содержания фторидов может свидетельствовать о защитной реакции организма, поскольку зуб «мудрости» прорезывается гипоминерализованным и эмаль необходимо насыщать важными ионами, чтобы укрепить кристаллическую решетку. Другой причиной увеличения содержания фторид-ионов можно считать сопутствующий воспалительный процесс и активное развитие бактериальной флоры, требующее дальнейшего назначения антибактериальных препаратов.

К ограничениям исследования можно отнести тот факт, что определение фторид-ионов проведено у жителей одного региона (Омская область), а также небольшую выборку пациентов в обеих исследованных группах, что обуславливает необходимость продолжения исследований по данной проблеме.

ВЫВОДЫ

У пациентов с множественным кариесом и острым перикоронитом наблюдается неблагоприятная ситуация по концентрации фторид-ионов в ротовой жидкости. Несмотря на устранение острого воспалительного процесса по поводу острого перикоронита, концентрация фторид-ионов не возвращается к нормальным интервальным значениям у пациентов из контрольной группы, в отличие от группы пациентов с удовлетворительным уровнем гигиены полости рта и значениями КПУ от 0 до 4,4. Несмотря на клиническую важность поступления фторид-ионов из ротовой жидкости, в том числе на этапе прорезывания зубов, этот процесс должен быть контролируемым и физиологическим, проходить с удовлетворительным уровнем гигиены и отсутствием очагов инфекции в полости рта. Метод капиллярного электрофореза можно использовать для определения концентрации фторид-ионов в ротовой жидкости.

Литература

1. Калюжная Е. Э., Просеков А. Ю., Волобаев В. П. Генотоксические свойства фторид-иона (обзор литературы). Гигиена и санитария. 2020; 3 (99): 253–58. DOI: 10.33029/0016-9900-2020-99-3-253-258.
2. Pramanik S, Saha D. The genetic influence in fluorosis. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2017; 56: 157–162. DOI: 10.1016/j.etap.2017.09.008.
3. Савченков М. Ф., Ефимова Н. В., Мануева Р. С., Николаева Л. А., Шин Н. С. Патология щитовидной железы у детского населения при сочетанном воздействии дефицита йода и фтористого загрязнения окружающей среды. Гигиена и санитария. 2016; 12 (95): 1201–5. DOI: 10.1882/0016-9900-2016-95-12-1201-1205.
4. Иорданишвили А. К. Фториды: их значение для здоровья человека в современных условиях и перспективы использования. Человек и его здоровье. 2019; 2: 66–72. DOI: 10.21626/vestnik/2019-2/07.
5. Иорданишвили А. К., Баринев Е. Х. Фториды и здоровье человека: современные аспекты применения. Здравоохранение Югры: опыт и инновации. 2022; 63 (7): 62–66.
6. Вагнер В. Д., Конев В. П., Коршунов А. С., Московский С. Н., Курятников К. Н., Скурихина А. П. Влияние дисплазии соединительной ткани на сроки прорезывания и степень минерализации зубов человека. *Стоматология.* 2021; 100 (5): 7–14. DOI: 10.17116/stomat20211000517.
7. Korshunov A, Vagner V, Konev V, Moskovskiy S, Kuryatnikov K, Skurikhina A, et al. Research of connective tissue dysplasia influence on teething. *Saudi Dent J.* 2022; 34 (5): 385–9. DOI: 10.1016/j.sdentj.2022.05.002.
8. Хмызова Т. Г., Осыко А. Н., Куркина В. М., Никитина Т. В. Применение фторидного лака duraphat для лечения очаговой деминерализации эмали. *Проблемы науки.* 2021; 5 (64): 72–74.
9. Кнаппвост А. Показания к применению и механизмы кариеспрофилактического действия препаратов глубокого фторирования — эмаль-герметизирующего и дентин-герметизирующего ликвидов. *Проблемы стоматологии.* 2005; 3: 3–8.
10. Алексеев Л. С., Ивлева Г. А., Аль-Амри З. Технические гигиенические аспекты фторирования питьевой воды. *Вестник МГСУ.* 2012; 3: 154–8.
11. Мозговая Л. А., Сивак Е. Ю., Соснин Д. Ю., Гавриленко М. С., Фокина Н. Б., Мозговая С. В. Особенности стоматологического статуса старших школьников в зависимости от минерального состава питьевой воды. *Пермский медицинский журнал.* 2021; XXXVIII (2): 79–87.
12. Зайцева Н. В., Землянова М. А., Булатова Н. И., Кольдибекова Ю. В. Исследование и оценка нарушений протеомного профиля плазмы крови, обусловленных повышенной концентрацией фторид-иона в моче у детей. *Здоровье населения и среда обитания.* 2019; 7 (316): 23–27. DOI: 10.35627/2219-5238/2019-316-7-23-27.
13. Khurshid Z, Warsi I, Moin SF, Slowey PD, Latif M, Zohaib S, et al. Biochemical analysis of oral fluids for disease detection. *Advances in Clinical Chemistry.* 2021; 100: 205–3. DOI: 10.1016/bs.acc.2020.04.005.
14. Roblegg E, Coughran A, Sirjani D. Saliva: An all-rounder of our body. *Eur J Pharm Biopharm.* 2019; 142: 133–41. DOI: 10.1016/j.ejpb.2019.06.016.
15. Kaczor-Urbanowicz KE, Wei F, Rao SL, Kim J, Shin H, Cheng J, et al. Clinical validity of saliva and novel technology for cancer detection. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2019; 1872 (1): 49–59. DOI: 10.1016/j.bbcan.2019.05.007.
16. Dawes C, Wong DTW. Role of Saliva and Salivary Diagnostics in the Advancement of Oral Health. *J Dent Res.* 2019; 98 (2): 133–41. DOI: 10.1177/0022034518816961.
17. Arunkumar S, Arunkumar JS, Krishna NB, Shakunthala GK. Developments in diagnostic applications of saliva in oral and systemic diseases — A comprehensive review. *Journal of Scientific and Innovative Research.* 2014; 3 (3): 372–87.
18. Сурсякова В. В., Рубайлова А. И. Изучение мешающего влияния органических кислот на определение фторид-ионов методом капиллярного электрофореза с применением хроматного фонового электролита. *Журнал Сибирского федерального университета.* 2017; 4: 573–79. DOI: 10.17516/1998-2836-0049.
19. Бельская Л. В., Сарф Е. А. Определение содержания

органических кислот в слюне больных раком молочной железы методом капиллярного электрофореза. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (7): 419–22.

20. Mori M, Ishikawa F, Tomoda T, Yamada S, Okamoto M, Itabashi H et al. Use of capillary electrophoresis with dual-opposite end injection for simultaneous analysis of small ions in saliva samples from wrestlers undergoing a weight training program. *Journal of Chromatography B*. 2016; 1012: 178–85.
21. Комарова Н. В., Каменцев Я. С. Практическое руководство по использованию систем капиллярного электрофореза «КАПЕЛЬ». СПб.: ООО «Веда», 2006; 212 с.
22. Бельская Л. В. Применение капиллярного электрофореза для определения минерального состава слюны человека. *Бюллетень науки и практики*. 2017; 2 (15): 132–40.
23. Дорогова В. Б., Шаяхметов С. Ф., Меринов А. В. Методические аспекты химико-аналитического контроля содержания фтора в биологических субстратах. *Сибирский медицинский журнал*. 2012; 7: 141–43.
24. Хамадеева А. М., Ногина Н. В., Лучшева Л. Ф., Баймуратова Л. Р. Особенности стоматологического здоровья детей в регионе с неблагоприятной экологической ситуацией на примере г. Чапаевска Самарской области. *Дальневосточный медицинский журнал*. 2018; 1: 67–72.
25. Яворская Т. Е. Сравнительная характеристика состава и свойств смешанной слюны у детей школьного возраста. *Acta medica Eurasica*. 2016; 1: 30–40.
26. Зайцева Н. В., Землянова М. А., Булатова Н. И., Кольдибекова Ю. В. Исследование и оценка нарушений протеомного профиля плазмы крови, обусловленных повышенной концентрацией фторид-иона в моче у детей. *Здоровье населения и среда обитания*. 2019; 7 (316): 23–27.
27. Аничкина Н. В. Исследования биогеохимии фтора в компонентах геосистем. *Научное обозрение. Биологические науки*. 2016; 3: 5–23.
28. Talwar M, Tewari A, Chawla HS, Sachdev V. A comparative assessment of fluoride concentration available in saliva using daily prescribed topical fluoride agents. *Indian J Dent*. 2016; 7 (2): 76–80. DOI: 10.4103/0975-962X.184647.
29. Sawan NM, Ben Gassem AA, Aldegheishem A, Alsagob EI, Alshami AA. Screening of fluoride analysis as a biochemical parameter in the orthodontic treatment using fixed appliances. *Saudi J Biol Sci*. 2022; 29 (3): 1668–1672. DOI: 10.1016/j.sjbs.2021.10.065.
30. Lacruz RS, Habelitz S, Wright JT, Paine ML. Dental enamel formation and implications for oral health and disease. *Physiol Rev*. 2017; 97 (3): 939–93. DOI: 10.1152/physrev.00030.2016.

References

1. Kalyuzhnaya EEh, Prosekov AYU, Volobaev VP. Genotoksicheskie svojstva ftorid-iona (obzor literatury). *Gigiena i sanitariya*. 2020; 3 (99): 253–58. DOI: 10.33029/0016-9900-2020-99-3-253-258. Russian.
2. Pramanik S, Saha D. The genetic influence in fluorosis. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2017; 56: 157–162. DOI: 10.1016/j.etap.2017.09.008.
3. Savchenkov MF, Efimova NV, Manueva RS, Nikolaeva LA, Shin NS. Patologiya shhitovidnoj zhelezy u detskogo naseleniya pri sochetannom vozdejstvii deficita joda i ftoristogo zagryazneniya okruzhayushhej sredy. *Gigiena i sanitariya*. 2016; 12 (95): 1201–5. DOI: 10.1882/0016-9900-2016-95-12-1201-1205. Russian.
4. Iordanishvili AK. Ftoryd: ix znachenie dlya zdorov'ya cheloveka v sovremennyx usloviyax i perspektivy ispol'zovaniya. *Chelovek i ego zdorov'e*. 2019; 2: 66–72. DOI: 10.21626/vestnik/2019-2/07. Russian.
5. Iordanishvili AK, Barinov EX. Ftorydy i zdorov'e cheloveka: sovremennye aspekty primeneniya. *Zdravooxranenie Yugry: opyt i innovacii*. 2022; 63 (7): 62–66. Russian.
6. Vagner VD, Konev VP, Korshunov AS, Moskovskij SN, Kuryatnikov KN, Skurixina A P. Vliyaniye displazii soedinitel'noj tkani na sroki prorezyvaniya i stepen' mineralizacii zubov cheloveka. *Stomatologiya*. 2021; 100 (5): 7–14. DOI: 10.17116/stomat20211000517. Russian.
7. Korshunov A, Vagner V, Konev V, Moskovskiy S, Kuryatnikov K, Skurikhina A, et al. Research of connective tissue dysplasia influence on teething. *Saudi Dent J*. 2022; 34 (5): 385–9. DOI: 10.1016/j.sdentj.2022.05.002.
8. Xmyzova TG, Osyko AN, Kurkina VM, Nikitina TV. Primenenie ftoridnogo laka duraphat dlya lecheniya ochagovoy demineralizacii ehmalii. *Problemy nauki*. 2021; 5 (64): 72–74. Russian.
9. Knappvost A. Pokazaniya k primeneniyu i mexanizmy kariesprofilakticheskogo dejstviya preparatov glubokogo ftorirovaniya — ehmal'-germetiziruyushhego i dentin-germetiziruyushhego likvidov. *Problemy stomatologii*. 2005; 3: 3–8.
10. Alekseev LS, Ileva GA, Al-Amri Z. Texniko-gigienicheskie aspekty ftorirovaniya pit'evoy vody. *Vestnik MGSU*. 2012; 3: 154–8. Russian.
11. Mozgovaya LA, Sivak EYu, Sosnin DYU, Gavrilenko MS, Fokina NB, Mozgovaya SV. Osobennosti stomatologicheskogo statusa starshix shkol'nikov v zavisimosti ot mineral'nogo sostava pit'evoy vody. *Permskij medicinskij zhurnal*. 2021; XXXVIII (2): 79–87. Russian.
12. Zajceva NV, Zemlyanova MA, Bulatova NI, Koldibekova YuV. Issledovanie i ocenka narushenij proteomnogo profilya plazmy krvi, obuslovlennyx povyshennoj koncentraciej ftorid-iona v moche u detej. *Zdorov'e naseleniya i sreda obitaniya*. 2019; 7 (316): 23–27. DOI: 10.35627/2219-5238/2019-316-7-23-27. Russian.
13. Khurshid Z, Warsi I, Moin SF, Slowey PD, Latif M, Zohaib S, et al. Biochemical analysis of oral fluids for disease detection. *Advances in Clinical Chemistry*. 2021; 100: 205–3. DOI: 10.1016/bs.acc.2020.04.005.
14. Roblegg E, Coughran A, Sirjani D. Saliva: An all-rounder of our body. *Eur J Pharm Biopharm*. 2019; 142: 133–41. DOI: 10.1016/j.ejpb.2019.06.016.
15. Kaczor-Urbanowicz KE, Wei F, Rao SL, Kim J, Shin H, Cheng J, et al. Clinical validity of saliva and novel technology for cancer detection. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2019; 1872 (1): 49–59. DOI: 10.1016/j.bbcan.2019.05.007.
16. Dawes C, Wong DTW. Role of Saliva and Salivary Diagnostics in the Advancement of Oral Health. *J Dent Res*. 2019; 98 (2): 133–41. DOI: 10.1177/0022034518816961.
17. Arunkumar S, Arunkumar JS, Krishna NB, Shakunthala GK. Developments in diagnostic applications of saliva in oral and systemic diseases — A comprehensive review. *Journal of Scientific and Innovative Research*. 2014; 3 (3): 372–87.
18. Sursyakova VV, Rubajlova AI. Izuchenie meshayushhego vliyaniya organicheskix kislot na opredelenie ftorid-ionov metodom kapillyarnogo ehlektroforeza s primeneniem xromatnogo fonovogo ehlektrolita. *Zhurnal Sibirskogo federal'nogo universiteta*. 2017; 4: 573–79. DOI: 10.17516/1998-2836-0049. Russian.
19. Belskaya LV, Sarf EA. Opredelenie soderzhaniya organicheskix kislot v slyune bol'nyx rakom molochnoj zhelezy metodom kapillyarnogo ehlektroforeza. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2018; 63 (7): 419–22. Russian.
20. Mori M, Ishikawa F, Tomoda T, Yamada S, Okamoto M, Itabashi H et al. Use of capillary electrophoresis with dual-opposite end injection for simultaneous analysis of small ions in saliva samples from wrestlers undergoing a weight training program. *Journal of Chromatography B*. 2016; 1012: 178–85.
21. Komarova NV, Kamencev YaS. Prakticheskoe rukovodstvo po ispol'zovaniyu sistem kapillyarnogo ehlektroforeza «KAPEL'». SPb.: ООО «Веда», 2006; 212 s. Russian.
22. Belskaya LV. Primenenie kapillyarnogo ehlektroforeza dlya opredeleniya mineral'nogo sostava slyuny cheloveka. *Byulleten' nauki i praktiki*. 2017; 2 (15): 132–40. Russian.
23. Dorogova VB, Shayaxmetov SF, Merinov AV. Metodicheskie aspekty ximiko-analiticheskogo kontrolya soderzhaniya ftora v biologicheskix substratax. *Sibirskij medicinskij zhurnal*. 2012; 7: 141–43. Russian.

24. Xamadeeva AM, Nogina NV, Luchsheva LF, Bajmuratova LR. Osobennosti stomatologicheskogo zdorov'ya detej v regione s neblagopriyatnoj ehkologicheskoy situaciej na primere g. Chapaevska Samarskoj oblasti. Dal'nevostochnyj medicinskij zhurnal. 2018; 1: 67–72. Russian.
25. Yavorskaya TE. Sravnitel'naya xarakteristika sostava i svojstv smeshannoj slyuny u detej shkol'nogo vozrasta. Acta medica Eurasica. 2016; 1: 30–40. Russian.
26. Zajceva NV, Zemlyanova MA, Bulatova NI, Koldibekova YuV. Issledovanie i ocenka narushenij proteomnogo profilya plazmy krovi, obuslovlennyx povyshennoj koncentraciej ftorid-iona v moche u detej. Zdorov'e naseleniya i sreda obitaniya. 2019; 7 (316): 23–27. Russian.
27. Anichkina NV. Issledovaniya biogeoximii ftora v komponentax geosistem. Nauchnoe obozrenie. Biologicheskie nauki. 2016; 3: 5–23. Russian.
28. Talwar M, Tewari A, Chawla HS, Sachdev V. A comparative assessment of fluoride concentration available in saliva using daily prescribed topical fluoride agents. Indian J Dent. 2016; 7 (2): 76–80. DOI: 10.4103/0975-962X.184647.
29. Sawan NM, Ben Gassem AA, Aldegheishem A, Alsagob EI, Alshami AA. Screening of fluoride analysis as a biochemical parameter in the orthodontic treatment using fixed appliances. Saudi J Biol Sci. 2022; 29 (3): 1668–1672. DOI: 10.1016/j.sjbs.2021.10.065.
30. Lacruz RS, Habelitz S, Wright JT, Paine ML. Dental enamel formation and implications for oral health and disease. Physiol Rev. 2017; 97 (3): 939–93. DOI: 10.1152/physrev.00030.2016.

IN SILICO-МОДЕЛИРОВАНИЕ В ОПТИМИЗАЦИИ АЛГОРИТМОВ ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ [$^{25}\text{Mg}^{2+}$] ПОРФИРИН-ФУЛЛЕРЕНОВЫХ НАНОЧАСТИЦ

В. В. Фурсов^{1,2} ✉, Д. И. Зинченко¹, Д. Д. Наместникова², Д. А. Кузнецов^{2,3}

¹ Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева, Москва, Россия

² Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

³ Федеральный исследовательский центр химической физики имени Н. Н. Семенова, Москва, Россия

Поиск эффективных фармакофоров для лечения ишемического инсульта актуален в связи с высокой распространенностью и смертностью от этого заболевания. Оптимизация сценариев доклинических исследований перспективных нейропротекторов средствами математического моделирования с использованием информационно-компьютерных технологий представляет собой отдельную актуальную задачу. Целью исследования было разработать препаратоприориентированную математическую модель в виде системы ОДУ, реализовать ее *in silico* в виде программного кода на языке MATLAB и адаптировать к экспериментальным данным, полученным *in vivo* на крысах. В работе проведено исследование *in silico* фармакокинетики порфирина-фуллереновых нанокатионитов, высвобождающих $^{25}\text{Mg}^{2+}$ типа PMC16. Разработана пятикомпарментная математическая модель, которую можно использовать для прогнозирования распределения наночастиц в органах и тканях, расчета оптимальных дозировок, периодичности введения и т. д. Представлены расчетные кривые распределения PMC16 в мозге, печени и сердце. Достигнуто хорошее соответствие полученных *in silico* фармакокинетических кривых с результатами экспериментов *in vivo* на крысах, у которых моделировали инсульт. Доказано преодоление наночастицами PMC16 гематоэнцефалического барьера.

Ключевые слова: ишемический инсульт, пенумбра, $^{25}\text{Mg}^{2+}$, нанокатиониты, фармакокинетика, дифференциальные уравнения, математическая модель

Финансирование: работа выполнена при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № 075-15-2020-792 (Уникальный идентификатор RF-190220X0031).

Вклад авторов: В. В. Фурсов — руководство *in silico* исследованием, идея, гипотеза, структура, моделирование, написание статьи; Д. И. Зинченко — моделирование, программный код, написание статьи; Д. Д. Наместникова — эксперимент *in vivo*; Д. А. Кузнецов — общее руководство проектом, анализ и обсуждение полученных данных, планирование эксперимента.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России (протокол № 140 от 15 декабря 2014 г.), а также университетской комиссией по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных (протокол № 13/2020 от 08 октября 2020 г., протокол № 24/2021 от 10 декабря 2021 г.).

✉ **Для корреспонденции:** Валентин Владимирович Фурсов
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997, Россия; vfursov@mail.ru

Статья получена: 05.07.2022 **Статья принята к печати:** 18.07.2022 **Опубликована онлайн:** 22.07.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.037

IN SILICO ALGORITHM FOR OPTIMIZATION OF PHARMACOKINETIC STUDIES OF [$^{25}\text{Mg}^{2+}$]PORPHYRIN-FULLERENE NANOPARTICLES

Fursov VV^{1,2} ✉, Zinchenko DI¹, Namestnikova DD², Kuznetsov DA^{2,3}

¹ Mendeleev University of Chemical Technology, Moscow, Russia

² Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

³ Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Moscow, Russia

The search for effective pharmacophores to treat ischemic stroke is precipitated by the prevalence and high mortality of the condition. Optimization of preclinical scenarios for promising neuroprotectants by mathematical modeling using up-to-date computational platforms is a well-defined and urgent task. This study aimed to develop a drug-oriented model represented by an ordinary differential equation system to study pharmacokinetics of $^{25}\text{Mg}^{2+}$ -releasing porphyrin-fullerene nanocationite PMC16 *in silico* using MATLAB and adjust computing model's adequateness using *in vivo* rat model. The developed five-compartment model predicts the distribution of nanoparticles in organs and tissues (e.g. the brain, the heart and the liver) for the purpose of experimental parameters optimization. The *in silico* produced pharmacokinetic curves show good agreement with the data obtained using *in vivo* rat model of ischemic stroke. The *in silico* and *in vivo* results indicate that PMC16 nanoparticles effectively cross the blood-brain barrier.

Keywords: ischemic stroke, penumbra, $^{25}\text{Mg}^{2+}$, nanocationites, pharmacokinetics, differential equations, mathematical modeling

Funding: the study was funded by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, grant No. 075-15-2020-792 (Unique identifier RF-190220X0031)

Author contribution: Fursov VV — *in silico* study supervision, concept, hypothesis, structure, modeling, manuscript writing; Zinchenko DI — modeling, code, manuscript writing; Namestnikova DD — *in vivo* experiments; Kuznetsov DA — general supervision, data interpretation and analysis, planning of experiments.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the ethical review board at the Pirogov Russian National Research Medical University (protocol № 140 of 15 December 2014) and the local committee for surveillance of the maintenance and use of laboratory animals (protocol № 13/2020 of 08 October 2020, protocol № 24/2021 of 10 December 2021).

✉ **Correspondence should be addressed:** Valentin V. Fursov
Ostrovityanova, 1, Moscow, 117997, Russia; vfursov@mail.ru

Received: 05.07.2022 **Accepted:** 18.07.2022 **Published online:** 22.07.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.037

Инсульт является второй по распространенности причиной смерти [1], ввиду чего исследования в области поиска эффективных фармакофоров для его лечения приобретают особенную актуальность. Разработка и внедрения фармацевтических средств — сложный и длительный процесс, требующий проведения обширных доклинических и клинических исследований. Оптимизация таких сценариев средствами математического моделирования с использованием информационно-компьютерных технологий представляет собой отдельную задачу научно-практического характера.

Так, трансляционные алгоритмы исследований в области современной фармакологии являются неотъемлемой частью протоколов доклинических или клинических испытаний нового инновационного лекарственного средства. Однако этот момент, без сомнения, трактуется по-разному в странах с разными социальными/культурными традициями и с различными экономико-правовыми системами.

Некоторые инновационные фармакофоры на основе наночастиц находятся в центре внимания долгосрочных программ доклинических исследований, принятых Шанхайской организацией сотрудничества (ШОС) на период 2020–2025 гг. [2, 3]. Примечательно, что это региональное политико-экономическое объединение девяти стран (Китай, Россия, Иран, Индия, Пакистан, Казахстан, Узбекистан, Таджикистан, Кыргызстан) с общим бюджетом почти в 26,8 млрд долларов США в настоящее время обеспечивает поддержку текущих разработок в области оптимизации доклинических исследований за счет повышения роли и значимости моделей нанофармакологии *in silico* [3, 4].

Некоторые этические и экономические несоответствия между «западными» и «восточными» точками зрения на разработку, исследование и регистрацию новых лекарств [2, 3] выглядят как сигнал к изменению нашего отношения к этой проблеме в пользу *in silico*, чтобы сократить как затраты, так и продолжительность процесса на трансляционные исследования фармакофоров. Очевидно, что финансовые проблемы, связанные со здравоохранением, и существующие трудности [4] диктуют принимать осторожную позицию по ряду деликатных вопросов, связанных с трансляционной медициной. В то же время есть заслуживающий внимания опыт усилий по оптимизации доклинических исследований, предпринятых в странах Евразийского региона за последние пять–семь лет.

Так, недавние трансляционные проекты, контролируемые ШОС, охватывают текущие исследования нейропротекторного потенциала порфирин-фуллереновых наночастиц, высвобождающих $^{25}\text{Mg}^{2+}$. Примечательным аспектом этого является активное использование платформ *in silico*, предназначенных для анализа аллометрических данных и данных *in vitro* для прогнозирования численных значений и уровней изменчивости наиболее важных фармакокинетических и фармакодинамических параметров [5–7].

Хотя история фармакологических исследований эффектов парамагнитных изотопов металлов насчитывает почти 15 лет [4–11], некоторые свойства трех изотопов: ^{25}Mg , ^{43}Ca , ^{67}Zn — были признаны фармакологически привлекательными для их адресной доставки с использованием наноносителей на основе порфирина-С60 [8–11]. Принимая во внимание все вышесказанное, целесообразно использовать платформу *in silico* с соответствующими трансляционными сценариями [4, 5, 11, 12].

Модифицированные алгоритмы немарковской популяционной динамики наряду с вычислительными

моделями на основе систем обыкновенных дифференциальных уравнений (ОДУ) эффективны для прогнозирования селективного накопления клетками головного мозга вышеупомянутых изотопов двухвалентных металлов (^{25}Mg , ^{43}Ca , ^{60}Co , ^{67}Zn), высвобождающихся из порфирин-фуллереновых наночастиц (PMC16) [3].

Целью исследования была разработка препаратом-ориентированной математической модели в виде системы ОДУ, реализация ее *in silico* в виде программного кода на языке MATLAB и адаптация к экспериментальным данным, полученным *in vivo* на крысах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

In silico исследование

Система обыкновенных дифференциальных уравнений (1), лежащая в основе математической модели, реализованной *in silico* была получена аналитическим путем на основе опубликованных данных биомедицинских исследований и собственных экспериментов *in vivo* по изучению влияния наночастиц (НЧ) порфирин-фуллерена, высвобождающих $^{25}\text{Mg}^{2+}$ на патогенез ишемического инсульта головного мозга, и смоделирована на языке MATLAB в среде MATLAB / SIMULINK версии 2021b. Для решения системы дифференциальных уравнений применяли метод Рунге–Кутты среднего порядка с использованием решателя ode45. $T_{1/2} = 9,0$ ч, $T_{\max} = 25$ ч, $C_0 = 62$ мкг/мл.

Для изучения поведения модели в пространстве параметров применяли теорию нелинейных динамических систем и использовали метод, известный как «параметрический анализ» (или «бифуркационный анализ» в синергетике) [14]. Метод эффективен для изучения сложных нелинейных процессов в неравновесных системах различного типа: физических, химических, социальных, биологических и др. по их математическим моделям в парадигме вычислительного эксперимента [14].

Для этого использовали адекватные экспериментальным данным *in vivo* параметры и по пятикомпарментному принципу построили математическую модель в виде системы ОДУ, которая после приведения к задаче Коши численным методом была переведена в машинный код и далее исследована методом параметрического анализа неравновесных процессов и систем на соответствие имеющимся экспериментальным данным.

Методом параметрического анализа [14] изучали поведение модели с различными динамическими комбинациями параметров для проверки степени валидности и адекватности предложенной *in silico* платформы и потенциала ее использования для решения фармакокинетических задач и перспективах применения для оптимизации алгоритмов доклинических исследований.

Эксперимент *in vivo*

Наночастицы

Водорастворимые образцы PMC16-RX были любезно предоставлены доктором Н. Амиршахи, Технологический университет имени Амира Кабира, Тегеран, Иран.

Животные

30 особей крыс-самцов Wistar Albino Glaxo (БиоПитомник СТЕЗАР; Владимир, Россия) весом 180–220 г содержали

на стандартной витаминизированной диете. Животные голодали в течение 24 ч перед экспериментом. Использовали три крысы на экспериментальную точку, проводили 5–6 повторений для каждого измерения. Все манипуляции с животными (включая вывод из эксперимента) проводили в соответствии с *arrive guidelines*.

Введение наночастиц

Наночастицы НЧ в концентрации 1,0 мг/кг и/или 20,0 мг/кг вводили крысам в виде однократной внутривенной инъекции. В качестве растворителя использовали 15 мм Трис-НСI (pH 7,80). Животных обезглавливали через 12 ч после инъекции, образцы ткани мозга гомогенизировали в 5–7 объемах 20 мМ Трис-НСI (pH 8,0) / 10 мМ MgCl₂ / 1,5 мМ NaCl / 2,0 мМ EDTA / 25 мМ сахараза/ 2,0% Triton X-100 (в/в). Использовали тефлон-стеклянный гомогенизатор Поттера 1800 об./мин (+4 °C).

Фракционирование гомогената ткани головного мозга

Для выделения фракции цитозоля (S125) тщательно промытые гомогенаты подвергали ультрацентрифугированию при 125 000 g, 4 ч, +4 °C, ультрацентрифуга Spinco L5-65B (Beckman; США), ротор SW 27.1. Супернатанты(S125) отбирали, измерения содержания белка проводили обычным колориметрическим методом Брэдфорда.

Образцы S125 смешивали с 10 объемами ледяного ацетона с последующей инкубацией в течение ночи при +4 °C. Осадки отделяли центрифугированием при 20 000 об./мин, 20 мин, +4 °C и отбрасывали. Супернатанты собирали для дальнейшего использования в УФ-спектрофотометрии и в исследованиях CZE.

Для оценки степени экстрагируемости НЧ из биоматериала ацетон-нерастворимые просушенные при 25 °C осадки растворяли в 15 мМ сульфата аммония (pH 8,80) / 0,1% SDS / 2,5 мМ ЭДТА-Na / 1,0% 2-меркаптоэтанол (20 : 1, v/w) с последующей ультразвуковой обработкой раствора при 60 KHz при 40 °C в течение 60 мин. Затем образцы анализировали с помощью нашей методики CZE (см. ниже).

Модель ишемического инсульта *in vivo*

Использовали рутинную модель окклюзии средней церебральной артерии крыс, которую достигли введением филамента, как описано ранее [15].

Таблица 1. Калибровка системы CZE: корреляция содержания внутреннего стандарта и величин оптической плотности идентифицированных фракций PMC16 (Rt = 7,0 мин)

PMC16-RX, нг/мг белка S125	(M + SEM), A ₄₄₀ /мл
1,0	0,09 ± 0,02
5,0	0,33 ± 0,08
10,0	0,61 ± 0,09
25,0	1,84 ± 0,08
50,0	3,87 ± 0,11
100,0	5,32 ± 0,50
200,0	8,55 ± 0,72
1000,0	12,89 ± 0,96

Примечание: состав CZE-анализируемого образца включает ацетон-растворимый пул цитозоля S125, смешанный с известными по массе добавлениями НЧ (1,0–1000,0 нг/мг общего белка цитозоля). Коэффициент корреляции $r = 0,86$; $n = 6$. Время удержания (эффективной миграции) НЧ Rt = 7,0 мин. Анализируемый образец CZE: пул, растворимый в ацетоне S125, смешанный с определенными количествами (1,0–200,0 нг/мг белка) целевого соединения PMC16-RX. Коэффициент корреляции $r = 0,86$; $n = 6$.

Оригинальная методика капиллярного зонального электрофореза (CZE)

Ацетон-растворимые экстракты S125 концентрировали в ротаторном испарителе, доводя объем образцов до 0,2–0,3 мл, и затем добавляли к полученному концентрату 30 мМ фосфата аммония (pH 8,80), 25 : 1, v/v. 10 мкл этого образца инъецировали в приемник аналитической системы P/ACE MDQ Plus CZE (ALIGIMED; Республика Беларусь), снабженной онлайн-детектором фракций UV-VIS 770 KS с монохроматическим фильтром 440 нм (Prince Technologies; Нидерланды).

CZE-процесс инициировали и осуществляли в течение 10 мин при +6 °C в кварцевом капилляре с размерами 50 мкм (диаметр) × 75 мм (эффективная длина), содержащим UV-транспарентный силикагель, насыщенный электролитом SJX40 с pH 8,0 (SCLEX, BV; Нидерланды).

Режим фракционирования: 115 V / 60 Hz / 300 W / капилляр. Блок планиграфического/временного анализа данных DAX DATE 220 LK (SCIEX BV; Нидерланды). Данные калибровки, осуществленной конвенциональным способом с использованием внутреннего стандарта по алгоритму, рекомендованному производителем аналитической системы (ALGIMED; Республика Беларусь), представлены в табл. 1.

Фармакокинетические кривые распределения PMC16 по органам представлены ниже. Доверительные интервалы рассчитывались по методу Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В основу нашей модели положено распространенное представление, согласно которому наноагент с кровотоком распространяется по организму, попадая в сердце, печень и мозг, и далее выводится путем естественной элиминации. При этом в зоне воспаления, сопутствующей ишемическому инсульту, происходит интенсивное накопление наноагента вследствие увеличения «пористости» сосудистого русла в связи с увеличением расстояния между эпителиальными клетками, формирующими сосудистые стенки. Модель представлена системой обыкновенных дифференциальных уравнений (ОДУ) (1) и схематично показана на рис. 1.

В системе ОДУ (1) C_b , C_p , C_h , C_{is} , C_{br} — концентрации наноагента в крови, печени, сердце, межклеточном пространстве головного мозга, клетках мозга. Компартмент «межклеточное пространство» был добавлен в рассмотрение, поскольку молекулы

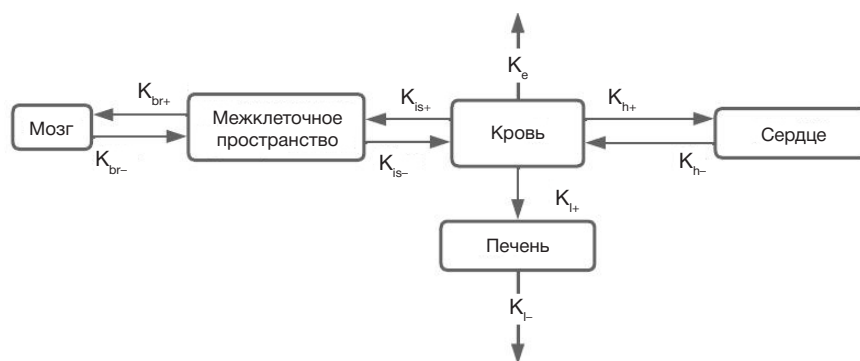


Рис. 1. Схема пятикомпарментной модели фармакокинетики PMC16

наноагента проникают через гематоэнцефалический барьер, непроницаемый в здоровой области мозга. Константа K_{is} настраивается в зависимости от величины поражения мозга. Чем больше область воспаления, тем больше значение константы.

K_e — константа элиминации наноагента. Остальные константы отражают скорость перехода молекул наноагента из одного компартамента в другой. Несложно заметить, что в сумме система дает только член $K_e C_b$, т. е. наноагент полностью выводится из организма. Вывод наноагента через печень для упрощения тоже введен в K_e , однако на метаболизм требуется время, что и отражают соответствующие печени константы.

$$\frac{dC_b}{dt} = -K_e C_b - K_{l+} C_b - K_{h+} C_b - K_{is+} C_b + K_{l-} C_l + K_{h-} C_h + K_{is-} C_{is}$$

$$\frac{dC_l}{dt} = K_{l+} C_b - K_{l-} C_l$$

$$\frac{dC_h}{dt} = K_{h+} C_b - K_{h-} C_h \quad (1)$$

$$\frac{dC_{is}}{dt} = K_{is+} C_b - K_{br+} C_{is} - K_{is-} C_{is} + K_{br-} C_{is}$$

$$\frac{dC_{br}}{dt} = K_{br+} C_{is} - K_{br-} C_{br}$$

Зная время полувыведения $T_{1/2}$ [5], можно оценить константу элиминации K_e как $\ln 2/T_{1/2}$.

Нами смоделировано однократное в/в введение вещества в дозе 0,2 мг/мкг. Известно, что для равномерного распределения фармакофора из места ввода по организму требуется время, но для упрощения расчетов диффузия не включена в модель, т. е. считается, что сразу же после введения концентрация наноагента одинакова в каждой точке.

Результаты расчета по модели в сопоставлении с данными наших экспериментов *in vivo* представлены на рис. 2.

In silico были промоделированы 24 ч пребывания фармакофора в организме, что представляет собой наиболее выраженный период развития ишемического инсульта. При увеличении параметра K_{h+} пик концентрации фармакофора в миокарде сдвигается влево и увеличивается. Согласно некоторым данным [16], концентрация фармакофора в печени быстро образует пик (в первый час) и так же быстро снижается, т. е. константа вывода из печени больше, чем константа поглощения. Однако K_{t+} меньше, чем K_{t-} . При уменьшении константы вывода K_{t-} сильно растет пик концентрации фармакофора. Константы, описывающие обмен фармакофора с мозгом, требуют дополнительных данных для своей оценки, однако из рис. 2 видно, что идет накопление фармакофора и концентрация его в тканях головного мозга количественно ниже, чем в печени и миокарде, что согласуется как с литературными данными [16], так и с данными, полученными нами *in vivo* в экспериментах на лабораторных животных.

На рис. 2 представлены расчетные и экспериментальные фармакокинетические кривые распределения PMC16 в головном мозге, печени и сердце. Расчетные кривые (показаны черным) имеют классическую форму и численно укладываются в доверительные интервалы экспериментальных данных, полученных нами *in vivo* на крысах, что доказывает адекватность математической модели натурному эксперименту.

Таким образом, экспериментально показано, что PMC16 преодолевает гематоэнцефалический барьер и проникает в клетки головного мозга, подвергнувшиеся ишемии, доставляя туда $^{25}\text{Mg}^{2+}$, стимулирующий гиперсинтез АТФ и способный служить перспективным нейропротектором. При этом количественное содержание фармакофора в головном мозге, сердце и печени различается. Такие же результаты демонстрирует и наша *in silico* модель, что подтверждает ее прогностический потенциал и перспективы применения для оптимизации алгоритмов доклинических исследований порфирин-фуллереновых нанокатионитов как потенциальных нейропротекторов.

Распределение НЧ PMC16 по сегментам пораженной ишемией области головного мозга представлено в табл. 2.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Решение фармакокинетической задачи для порфирин-фуллереновых наноагентов в целях оптимизации алгоритмов доклинических исследований возможно *in silico* в парадигме вычислительного эксперимента [17, 18]. При этом следует моделировать не только фармакокинетику (ФК) (т. е. доставку фармакофора в выделенный орган), что сделано в настоящей работе для PMC16, но и фармакодинамику (ФД) или, иными словами, динамику достижения терапевтического эффекта воздействия фармакофора на развитие исследуемой патологии. А это значит, что помимо модели самого заболевания (в нашем случае ишемического инсульта) необходимо иметь модель фармакокинетики исследуемого фармакофора и модель его фармакодинамического воздействия. Речь идет о комплексной ФК/ФД модели как перспективе наших дальнейших исследований в направлении *in silico*.

Такие исследования осложняются не только недостатком в литературе релевантных описаний математических моделей ишемического инсульта, подходящих для этой цели, но и отсутствием фармакокинетических моделей, инновационных фармакофоров, фармакокинетика которых может иметь ярко выраженный препаратоспецифичный характер, особенно когда идет речь об их адресной доставке. Бурно развивающаяся отрасль нанофармакологии предлагает ряд таких наноагентов, фармакокинетика которых отличается от традиционных лекарств, но в то же время

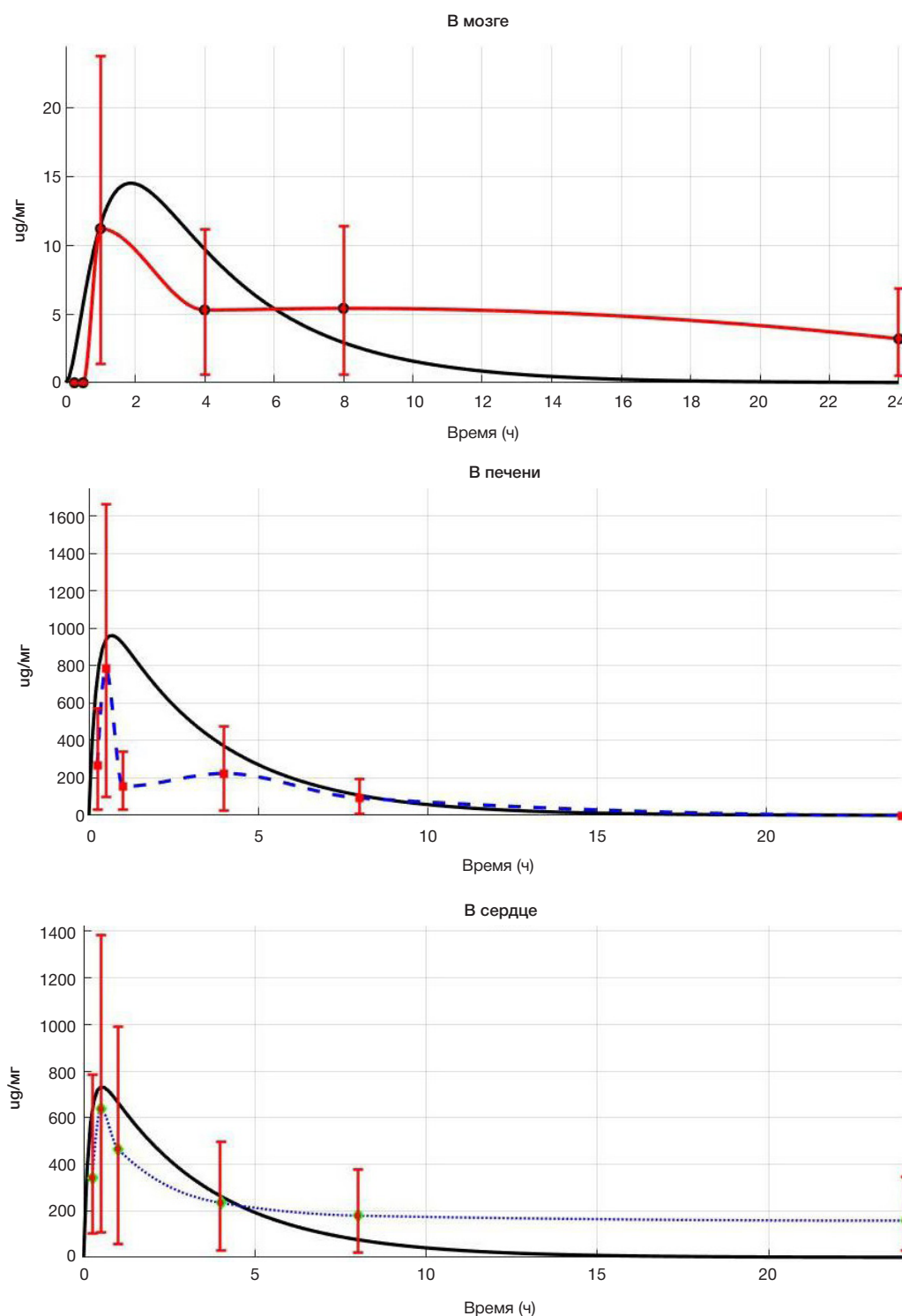


Рис. 2. Фармакокинетические кривые, рассчитанные по модели (показаны черным) в сравнении с экспериментальными данными: в мозге, печени, сердце ($K_{tm} = 0,50$; $K_p = 2$; $K_{tp} = 0,50$; $K_m = 6$; $K_{tm} = 0,50$; $K_e = 0,077$; $K_{dp} = 0,70$; $K_{dm} = 0,70$; $K_{sm} = 0,10$; $K_{sp} = 0,10$)

перспективы применения их в качестве нейропротекторов трудно переоценить [19].

Все вышесказанное непосредственно относится к линейке отечественных фармакофоров PMC16, перспективы применения которых к терапии ишемического инсульта оценены чрезвычайно высоко. В основе их действия лежит фундаментальное открытие магнитоизотопного эффекта $^{25}\text{Mg}^{2+}$. Доказано, что магнитный изотоп магния $^{25}\text{Mg}^{2+}$ является гиперактиватором большинства Mg-зависимых реакций синтеза АТФ в клетке, причем гиперактивация энергетического метаболизма ионами

$^{25}\text{Mg}^{2+}$ требует незначительного количества этих ионов и имеет место даже при отсутствии кислорода (глубокая тканевая гипоксия) [16], в связи с чем и был предложен PMC16 — фармацевтический наноагент, основанный на порфирина-содержащем фуллереновом «шаре» C60 (порфиллерен-MC16) [20, 21].

Основным ключевым моментом экспериментальной проверки такой парадигмы *in silico*, как наша, является доказательство как проницаемости ГЭБ, так и интрализации клеток головного мозга в отношении наночастиц PMC16. Эта задача была решена (рис. 2; табл. 1 и 2). Примечательно, что

Таблица 2. Проницаемость ГЭБ для PMC16-RX и интернализация фармакофора в клетках головного мозга

Содержание НЧ в цитозоле, нг/мг белка S125 (M ± SEM, n = 6)		
НЕПОВРЕЖДЕННАЯ ТКАНЬ МОЗГА	ПЕНУМБРА	ОБЛАСТЬ ИНСУЛЬТА
7,83 ± 0,66	8,85 ± 0,74	4,11 ± 0,28

Примечание: 20 мг PMC16-RX на 1,0 кг массы тела крысы внутривенно через 12 ч после однократной инъекции.

участки тканей, поврежденные мозговым инсультом, тоже были доступны для PMC16 (табл. 2).

Таким образом, относительно низкий «уровень массового количества» интралинизации NP в клетках мозга крыс (табл. 1) может не иметь ничего общего с ожидаемым фармакологическим воздействием агента, поскольку последнее в любом случае будет обусловлено чрезвычайным перепроизводством АТФ, т. е. прямым и неизбежным результатом феномена $^{25}\text{Mg}^{2+}$ — МПЕ. Излишне подчеркивать, что сама по себе интралинизация фармакофора является истинным приоритетом в передовых исследованиях фармакокинетики.

Простое одноэтапное ультрацентрифугирование гомогенатов тканей млекопитающих, обычно предварительно обработанных Triton X-100 (105 000–150 000 г), обеспечивает надежное отделение цитозоля от клеточных органелл, а также от рибосом, рибосомных субъединиц и мембранных дебри. Таким образом, фракция S125, представляющая собой раствор соединений общей цитоплазмы, является идеальным материалом для использования в исследованиях по интралинизации лекарственных фармакофоров в клетках [3, 4, 10].

Хотя представленные результаты выглядят вполне самодостаточными, следует отметить, что разрешение и чувствительность нашей процедуры CZE достаточно хороши, чтобы определить низкий, но определяемый

уровень поглощения PMC16-RX мозгом крыс, оцениваемый в 4,0–8,0 нг на 1,0 мг общего белка S125. Это количество НЧ можно обнаружить через 12 ч после однократной внутривенной инъекции средства. А данные калибровки CZE/PMC16-RX находятся за пределами (табл. 1). Таким образом, проникновение через гематоэнцефалический барьер для тестируемых ксенобиотиков было четко показано (табл. 1, 2).

ВЫВОДЫ

Представленная модель *in silico* описывает фармакокинетику наночастиц PMC16 как перспективных нейропротекторов применительно к терапии ишемического инсульта. Распределение PMC16 по органам и тканям описана математически в формате пятикомпарментной модели, представленной системой ОДУ и реализованной на РС. Настройку модели на особенности биологических объектов можно осуществить изменением численных значений констант в соответствии с данными экспериментов *in vivo*. Модель согласуется как с имеющимися литературными данными, так и с данными экспериментов на лабораторных животных и может быть использована для оптимизации сценариев доклинических исследований медицинских нанокатионитов PMC16 в качестве нейропротекторов при терапии ишемического инсульта.

Литература

- Global health estimates: Leading causes of death. World Health Organization. Available from (дата обращения: 25.05.22): <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates/gho-leading-causes-of-death>.
- Li G, Liu Y, He R, et al. FDA decisions on new oncological drugs. *Lancet Oncology*. 2022; 23 (5): 583–5.
- Benjamin DJ, Prasad V, Lythgoe MP. FDA decisions on new oncological drugs. *Lancet Oncology*. 2022; 23 (5): 585–6.
- Das M. Biden's proposed investment in cancer research sparks concerns. *Lancet Oncology*. 2022; 23 (5): 576–80.
- Jun Z. SCO, a unique regional project. *St. Petersburg State Polytechnical University Journal*. 2016; 239 (1): 98–101.
- Vasiliev AA, Spaper D, Ibragimov ZI. Ways to step up the international scientific and technological cooperation of the SCO countries. *Russian Asian Law Journal*. 2020; 13 (2): 92–6.
- Kazemzadeh H, Mozafari M. Fullerene – based delivery systems. *Drug Discovery Today*. 2019; 24 (3): 898–05.
- Kuznetsov D, Roumiantsev S, Fallahi M, et al. Non-Markovian population dynamics: does it help to optimize the chemotherapeutic strategy? *International Journal of Biomedical Science*. 2010; 6 (1): 20–6.
- Bukhvostov AA, Dvornikov AS, Ermakov KV, Kuznetsov DA. Critical Study of Retinoblastoma Case: Shall We Get a Paramagnetic Trend in Chemotherapy? (2020) In: Quershi NA, editor. *Current Topics in Medicine and Medical Research*. Science Domain Publ., Ltd: Hoogley – London – New York, 2020; 1: 72–78.
- Orlova MA, Osipova EY, Roumiantsev SA. Effect of 67Zn-nanoparticles in leukemic and normal lymphocytes. *British Journal of Medicine and Medical Research*. 2012; 2 (1): 21–30.
- Buchachenko AL, Bukhvostov AA, Ermakov KV, et al. A specific role of magnetic isotopes. *Physics and biophysics beyond. Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 2020; 155 (1): 1–20.
- Фурсов И. В., Зинченко Д. И., Фурсов В. В., Ананишнев В. М. Технологии искусственного интеллекта в здравоохранении. Создание *in silico*-алгоритмов для оптимизации в экспериментальной нанофармакологии ишемического инсульта. Сборник работ преподавателей, аспирантов и студентов. М.: Перо, 2022; с. 30–33.
- Johansen RJ, Bukhvostov AA, Ermakov KV, Kuznetsov DA. Towards a computational prediction for the tumor selective accumulation of paramagnetic nanoparticles in retinoblastoma cells. *Bulletin of Russian State Medical University*. 2018; 6: 68–73. DOI: 10.24075/brsmu.2018.078. – EDN YZGOXB.
- Куркина Е. С. Моделирование нелинейных явлений в физико-химических системах: Автоколебания. Структуры. Волны. С подробными примерами в MATLAB. М.: ЛЕНАНД, 2019; 248 с.
- Gubsky IL, Namestnikova DD, Cherkashova EA, Chekhonin VP, Baklaushchev VP, Gubsky LV, Yarygin KN. MRI guiding of the middle cerebral artery occlusion in rats aimed to improve stroke modeling. *Translational Stroke Research*. 2018; 9: 417–25.
- Sarkar S, et al. Use of a magnesium isotope for treating hypoxia and a medicament comprising the same: заяв. пат. 12123245 США, 2008.
- Фурсов В. В., Ананьев А. В., Ананьев В. Н. Компьютерная математическая модель патофизиологических изменений участка мозговой ткани при развитии инсульта. Естественные и технические науки. 2022; 5 (168): 173–7.
- Fursov VV, et al. *In silico* studies on pharmacokinetics and

neuroprotective potential of $^{25}\text{Mg}^{2+}$: releasing nanocationites — background and perspectives. *Pharmacogenetics*. 2021; p. 155.

19. Амиршахи Н. и др. Порфирин-фуллереновые наночастицы для лечения гипоксических кардиопатий. *Российские нанотехнологии*. 2008; 3 (9–10): 125–35.
20. Саркар С., Резаят С. М., Бучаченко А. Л., Кузнецов Д. А., Орлова М. А., Юровская М. А., Трушков И. В. (2007) Новые водорастворимые порфиллереновые соединения. Патент

Европейского союза № 07009882.7/EP07009882 (per.: Мюнхен, Германия).

21. Johansen RJ, Bukhvostov AA, Ermakov KV, Kuznetsov DA. Towards a computational prediction for the tumor selective accumulation of paramagnetic nanoparticles in retinoblastoma cells. *Bulletin of Russian State Medical University*. 2018; 6: 68–73. DOI: 10.24075/brsmu.2018.078. – EDN YZGOXB.
14. Kurkina ES. Modelirovanie nelineynykh yavleniy v fiziko-khimicheskikh sistemakh: Avtokolebaniya. *Struktury. Volny. S podrobnymi primerami v MATLAB*. М.: LENAND, 2019; 248 s. Russian.
15. Gubsky IL, Namestnikova DD, Cherkashova EA, Chekhonin VP, Baklaushev VP, Gubsky LV, Yarygin KN. MRI guiding of the middle cerebral artery occlusion in rats aimed to improve stroke modeling. *Translational Stroke Research*. 2018; 9: 417–25.
16. Sarkar S, et al. Use of a magnesium isotope for treating hypoxia and a medicament comprising the same: заяв. пат. 12123245 США, 2008.
17. Fursov VV, Ananov AV, Ananov VN. Komp'yuternaya matematicheskaya model' patofiziologicheskikh izmeneniy uchastka mozgovoy tkani pri razvitiy insul'ta. *Estestvennye i tekhnicheskie nauki*. 2022; 5 (168): 173–7. Russian.
18. Fursov VV, et al. In silico studies on pharmacokinetics and neuroprotective potential of $^{25}\text{Mg}^{2+}$: releasing nanocationites — background and perspectives. *Pharmacogenetics*. 2021; p. 155.
19. Amirshakhi N, i dr. Porfirin-fullerenovye nanochastitsy dlya lecheniya gipoksicheskikh kardiopatii. *Rossiyskie nanotekhnologii*. 2008; 3 (9–10): 125–35. Russian.
20. Sarkar S, Rezayat SM, Buchachenko AL, Kuznetsov DA, Orlova MA, Yurovskaya MA, Trushkov IV. (2007) Novye vodorastvorimye porfillerrenovye soedineniya. Patent Evropeyskogo soyuza № 07009882.7/EP07009882 (reg.: Myunkhen, Germaniya). Russian.
21. Sarkar S, Rezayat SM, Buchachenko AL, Kuznetsov DA, Orlova MA, Yurovskaya MA, Trushkov IV. (2007) Ispol'zovanie izotopa magniya dlya lecheniya gipoksii i lekarstvennogo sredstva, soderzhashchego ego. Patent Evropeyskogo soyuza № 07009881.9/EP07009881 (reg.: Myunkhen, Germaniya).

References

1. Global health estimates: Leading causes of death. World Health Organization. Available from (дата обращения: 25.05.22): <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates/ghle-leading-causes-of-death>.
2. Li G, Liu Y, He R, et al. FDA decisions on new oncological drugs. *Lancet Oncology*. 2022; 23 (5): 583–5.
3. Benjamin DJ, Prasad V, Lythgoe MP. FDA decisions on new oncological drugs. *Lancet Oncology*. 2022; 23 (5): 585–6.
4. Das M. Biden's proposed investment in cancer research sparks concerns. *Lancet Oncology*. 2022; 23 (5): 576–80.
5. Jun Z. SCO, a unique regional project. *St. Petersburg State Polytechnical University Journal*. 2016; 239 (1): 98–101.
6. Vasiliev AA, Spaper D, Ibragimov ZI. Ways to step up the international scientific and technological cooperation of the SCO countries. *Russian Asian Law Journal*. 2020; 13 (2): 92–6.
7. Kazemzadeh H, Mozafari M. Fullerene – based delivery systems. *Drug Discovery Today*. 2019; 24 (3): 898–05.
8. Kuznetsov D, Roumiantsev S, Fallahi M, et al. Non-Markovian population dynamics: does it help to optimize the chemotherapeutic strategy? *International Journal of Biomedical Science*. 2010; 6 (1): 20–6.
9. Bukhvostov AA, Dvornikov AS, Ermakov KV, Kuznetsov DA. Critical Study of Retinoblastoma Case: Shall We Get a Paramagnetic Trend in Chemotherapy? (2020) In: Quershi NA, editor. *Current Topics in Medicine and Medical Research*. Science Domain Publ., Ltd: Hoogley – London – New York, 2020; 1: 72–78.
10. Orlova MA, Osipova EY, Roumiantsev SA. Effect of ^{67}Zn -nanoparticles in leukemic and normal lymphocytes. *British Journal of Medicine and Medical Research*. 2012; 2 (1): 21–30.
11. Buchachenko AL, Bukhvostov AA, Ermakov KV, et al. A specific role of magnetic isotopes. *Physics and biophysics beyond. Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 2020; 155 (1): 1–20.
12. Fursov IV, Zinchenko DI, Fursov VV, Ananishnev VM. Tekhnologii iskusstvennogo intellekta v zdravookhraneni. Sozdanie In Silico — algoritmov dlya optimizatsii v eksperimental'noy nanofarmakologii ishemicheskogo insul'ta. *Sbornik rabot prepodavateley, aspirantov i studentov*. М.: Pero, 2022; s. 30–33. Russian.
13. Johansen RJ, Bukhvostov AA, Ermakov KV, Kuznetsov DA. Towards a computational prediction for the tumor selective accumulation of paramagnetic nanoparticles in retinoblastoma cells. *Bulletin of Russian State Medical University*. 2018; 6: 68–73. DOI: 10.24075/brsmu.2018.078. – EDN YZGOXB.
14. Kurkina ES. Modelirovanie nelineynykh yavleniy v fiziko-khimicheskikh sistemakh: Avtokolebaniya. *Struktury. Volny. S podrobnymi primerami v MATLAB*. М.: LENAND, 2019; 248 s. Russian.
15. Gubsky IL, Namestnikova DD, Cherkashova EA, Chekhonin VP, Baklaushev VP, Gubsky LV, Yarygin KN. MRI guiding of the middle cerebral artery occlusion in rats aimed to improve stroke modeling. *Translational Stroke Research*. 2018; 9: 417–25.
16. Sarkar S, et al. Use of a magnesium isotope for treating hypoxia and a medicament comprising the same: заяв. пат. 12123245 США, 2008.
17. Fursov VV, Ananov AV, Ananov VN. Komp'yuternaya matematicheskaya model' patofiziologicheskikh izmeneniy uchastka mozgovoy tkani pri razvitiy insul'ta. *Estestvennye i tekhnicheskie nauki*. 2022; 5 (168): 173–7. Russian.
18. Fursov VV, et al. In silico studies on pharmacokinetics and neuroprotective potential of $^{25}\text{Mg}^{2+}$: releasing nanocationites — background and perspectives. *Pharmacogenetics*. 2021; p. 155.
19. Amirshakhi N, i dr. Porfirin-fullerenovye nanochastitsy dlya lecheniya gipoksicheskikh kardiopatii. *Rossiyskie nanotekhnologii*. 2008; 3 (9–10): 125–35. Russian.
20. Sarkar S, Rezayat SM, Buchachenko AL, Kuznetsov DA, Orlova MA, Yurovskaya MA, Trushkov IV. (2007) Novye vodorastvorimye porfillerrenovye soedineniya. Patent Evropeyskogo soyuza № 07009882.7/EP07009882 (reg.: Myunkhen, Germaniya). Russian.
21. Sarkar S, Rezayat SM, Buchachenko AL, Kuznetsov DA, Orlova MA, Yurovskaya MA, Trushkov IV. (2007) Ispol'zovanie izotopa magniya dlya lecheniya gipoksii i lekarstvennogo sredstva, soderzhashchego ego. Patent Evropeyskogo soyuza № 07009881.9/EP07009881 (reg.: Myunkhen, Germaniya). Russian.