



ISSN 2410- 5155 (Online), ISSN 2311- 4495 (Print)

# Трансляционная Медицина Translational Medicine

Научно-практический рецензируемый медицинский журнал

том 10 № 6 / 2023

Фундаментальная медицина  
Сердечно-сосудистые заболевания  
Эндокринология  
Нейронауки  
Педиатрия и детская хирургия  
Неонатология  
Лучевая диагностика  
Акушерство и гинекология  
Онкология  
Гематология

Главный редактор  
Академик РАН  
Е.В. Шляхто



ПЕТРУ ПЕРВОМУ  
ЕКАТЕРИНА ВТОРАЯ  
1713



ISSN 2410-5155 (Online), ISSN 2311-4495 (Print)

# Трансляционная Медицина

## Translational Medicine

Научно-практический рецензируемый медицинский журнал

том 10 № 6 / 2023

Фундаментальная медицина  
Сердечно-сосудистые заболевания  
Эндокринология  
Нейронауки  
Педиатрия и детская хирургия  
Неонатология  
Лучевая диагностика  
Акушерство и гинекология  
Онкология  
Гематология

---

Главный редактор  
Академик РАН  
Е.В. Шляхто

**Национальный медицинский  
исследовательский центр им. В. А. Алмазова  
Министерства здравоохранения Российской Федерации**



**ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР**

Шляхто Е. В.

**ЗАМЕСТИТЕЛИ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА:**

Конради А. О.

Галагудза М. М.

**ТЕХНИЧЕСКИЙ РЕДАКТОР**

Докшин П. М.

**РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:**

Беленков Ю. Н. (Москва)  
Вавилова Т. В. (Санкт-Петербург)  
Вебер В. Р. (Великий Новгород)  
Волкова Н. И. (Ростов-на-Дону)  
Галявич А. С. (Казань)  
Гринева (Санкт-Петербург)  
Гринштейн Ю. И. (Красноярск)  
Даренская М. А. (Иркутск)  
Ефремушкина А. А. (Барнаул)  
Захарова И. Н. (Москва)  
Зенин С. А. (Новосибирск)  
Королев Д. В. (Санкт-Петербург)  
Кашталап В. В. (Кемерово)  
Климонтов В. В. (Новосибирск)  
Костарева А. А. (Санкт-Петербург)  
Лебедев Д. С. (Санкт-Петербург)  
Лопатин Ю. М. (Волгоград)

Макаров С. А. (Кемерово)  
Малашичева А. Б. (Санкт-Петербург)  
Меликян М. А. (Москва)  
Моисеева О. М. (Санкт-Петербург)  
Неймарк М. И. (Барнаул)  
Никитина И. Л. (Санкт-Петербург)  
Протасов К. В. (Иркутск)  
Рыжкова Д. В. (Санкт-Петербург)  
Рябов В. В. (Томск)  
Савченко А. А. (Красноярск)  
Садыкова Д. И. (Казань)  
Самородов А. В. (Уфа)  
Сироткина О. В. (Санкт-Петербург)  
Троян В. Н. (Москва)  
Усов В. Ю. (Томск)  
Чесникова А. И. (Ростов-на-Дону)  
Шаповалов К. Г. (Чита)

**РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:**

Ольшанский Б. (США)  
Ханссон Г. (Швеция)  
Сёберг Г. (Швеция)  
Керр Д. (США)  
Бакс Ж. (Нидерланды)  
Массард Ж. (Франция)  
Орлов М. (США)  
Содер О. (Швеция)  
Феррари Р. (Италия)  
Хельманн Р. (Германия)  
Сили-Торок Т. (Нидерланды)  
Сейерсен Т. (Швеция)  
Вааге Я. (Норвегия)  
Беркович О. А. (Санкт-Петербург)  
Виллевальде С. В. (Санкт-Петербург)  
Головкин А. С. (Санкт-Петербург)  
Голухова Е. З. (Москва)  
Гудкова А. Я. (Санкт-Петербург)  
Гурьева И. В. (Москва)  
Дземешкевич С. Л. (Москва)  
Жлоба А. А. (Санкт-Петербург)  
Зазерская И. Е. (Санкт-Петербург)  
Заклязьменская Е. В. (Москва)  
Звартау Н. Э. (Санкт-Петербург)  
Калуев А. В. (Санкт-Петербург)  
Карпенко М. А. (Санкт-Петербург)  
Карпов Р. С. (Томск)  
Козырев С. В. (Санкт-Петербург)  
Кухарчик Г. А. (Санкт-Петербург)  
Лишманов Ю. Б. (Томск)  
Ломиворотов В. В. (Новосибирск)  
Мазурок В. А. (Санкт-Петербург)  
Маслов Л. Н. (Томск)  
Мельниченко Г. А. (Москва)  
Михайлов Е. Н. (Санкт-Петербург)  
Мосоян М. С. (Санкт-Петербург)  
Недошивин А. О. (Санкт-Петербург)  
Неймарк А. Е. (Санкт-Петербург)  
Поддубный И. В. (Москва)  
Пузырев В. П. (Томск)  
Салогуб Г. Н. (Санкт-Петербург)  
Самочерных К. А. (Санкт-Петербург)  
Сидоркевич С. В. (Санкт-Петербург)  
Ткачук В. А. (Москва)  
Труфанов Г. Е. (Санкт-Петербург)  
Фадеев В. В. (Москва)  
Чернявский М. А. (Санкт-Петербург)  
Шевцов М. А. (Санкт-Петербург)

Журнал зарегистрирован в Государственном комитете РФ по печати.

Свидетельство о рег. ПИ № ФС77–56793 от 29.01.2014 г.

Журнал включен в Российский индекс научного цитирования

Журнал включен Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации в «Перечень российских рецензируемых научных журналов, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученых степеней доктора и кандидата наук».

Периодичность — 6 выпусков в год. Тираж — 1100 экземпляров.

Тематическая рассылка по специалистам.

Верстка — Л. П. Попова. Корректра — А. В. Медведева

**Издательство «ФОНД АЛМАЗОВА»**

Адрес: 197341, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, д. 2

Телефон издательства: +7(812)702–37–16

Отпечатано в ООО «Типография Принт24»

Санкт-Петербург, ул. Самойловой, 5

Подача рукописей и переписка с авторами, размещение рекламы и подписка —

**e-mail:** [buletен@almazovcentre.ru](mailto:buletен@almazovcentre.ru)

**Подписка по каталогу агентства «Роспечать»: подписной индекс 57996**

Архив номеров: [http://www.almazovcentre.ru/?page\\_id=20396](http://www.almazovcentre.ru/?page_id=20396)

[http://elibrary.ru/title\\_about.asp?id=50986](http://elibrary.ru/title_about.asp?id=50986)

Все права защищены. © 2023.

Полное или частичное воспроизведение материалов, опубликованных в журнале, допускается только с письменного разрешения редакции.

*Редакция не несет ответственности за содержание рекламных материалов*

Выход в свет 09.01.2024

18+

V. A. Almazov National  
Medical Research Centre

Ministry of Health of the Russian Federation

ISSN 2311-4495 (printed)  
ISSN 2410-5155 (online)



**EDITOR-IN-CHIEF**

Evgeny Shlyakhto

**DEPUTY EDITORS:**

Alexandra Konradi

Mikhail Galagudza

**TECHNICAL EDITOR**

Pavel Docshin

**EDITORIAL BOARD:**

Yu. Belenkov (Moscow)	M. Neimark (Barnaul)
A. Chesnikova (Rostov-on-Don)	I. Nikitina (St. Petersburg)
M. Darenskaya (Irkutsk)	K. Protasov (Irkutsk)
A. Efremushkina (Barnaul)	V. Ryabov (Tomsk)
A. Galyavich A. S. (Kazan)	D. Ryzhkova (St. Petersburg)
E. Grineva (St. Petersburg)	D. Sadykova (Kazan)
Yu. Grinshtein (Krasnoyarsk)	A. Samorodov (Ufa)
V. Kashtalap (Kemerovo)	A. Savchenko (Krasnoyarsk)
V. Klimontov (Novosibirsk)	K. Shapovalov (Chita)
D. Korolev (St. Petersburg)	O. Sirotkina (St. Petersburg)
A. Kostareva (St. Petersburg)	V. Troyan (Moscow)
D. Lebedev (St. Petersburg)	V. Usov (Tomsk)
Yu. Lopatin (Volgograd)	T. Vavilova (St. Petersburg)
S. Makarov (Kemerovo)	N. Volkova (Rostov-on-Don)
A. Malashicheva (St. Petersburg)	V. Weber (Veliky Novgorod)
M. Melikyan (Moscow)	I. Zakharova (Moscow)
O. Moiseeva (St. Petersburg)	S. Zenin (Novosibirsk)

**INTERNATIONAL EDITORIAL  
COUNCIL:**

J. Bax (Netherlands)  
R. Ferrari (Italy)  
G. Hansson (Sweden)  
R. Hehlmann (Germany)  
D. Kerr (USA)  
G. Massard (France)  
B. Olshansky (USA)  
M. Orlov (USA)  
T. Sejersen (Sweden)  
G. Sjöberg (Sweden)  
O. Söder (Sweden)  
T. Szili-Torok (Netherlands)  
J. Vaage (Norway)  
O. Berkovich (St. Petersburg)  
M. Chernyavsky (St. Petersburg)  
S. Dzemeshevich (Moscow)  
V. Fadeev (Moscow)  
A. Golovkin (St. Petersburg)  
E. Golukhova (Moscow)  
A. Gudkova (St. Petersburg)  
I. Guryeva (Moscow)  
A. Kaluev (St. Petersburg)  
M. Karpenko (St. Petersburg)  
R. Karpov (Tomsk)  
S. Kozyrev (St. Petersburg)  
G. Kukharchik (St. Petersburg)  
Yu. Lishmanov (Tomsk)  
V. Lomivorotov (Novosibirsk)  
L. Maslov (Tomsk)  
V. Mazurok (St. Petersburg)  
G. Melnichenko (Moscow)  
E. Mikhailov (St. Petersburg)  
M. Mosoyan (St. Petersburg)  
A. Nedoshivin (St. Petersburg)  
A. Neumark (St. Petersburg)  
I. Poddubny (Moscow)  
V. Puzyrev (Tomsk)  
G. Salogub (St. Petersburg)  
K. Samochnykh (St. Petersburg)  
M. Shevtsov (St. Petersburg)  
S. Sidorkevich (St. Petersburg)  
V. Tkachuk (Moscow)  
G. Trufanov (St. Petersburg)  
S. Villevalde (St. Petersburg)  
E. Zaklyazmenskaya (Moscow)  
I. Zazerskaya (St. Petersburg)  
A. Zhloba (St. Petersburg)  
N. Zvartau (St. Petersburg)

Journal is registered in State Committee for Publishing of the Russian Federation.

Certificate of registration. ПИ № ФС77-56793 on 29.01.2014

The Journal is included in the Russian Citation Index

The journal is listed among Russian peer-reviewed scientific journals approved by the Higher Attestation Commission of the Russian Ministry of Education and Science for the publication of major scientific results of theses for academic degrees of Doctor and Candidate of Sciences.

Periodicity — 6 issues per year. Edition 1100 copies.

Distribution to specialists.

Make-up — L. P. Popova. Proofreader — A. V. Medvedeva

**Publisher «ALMAZOV FOUNDATION»**

**Address:** 197341, Saint-Petersburg, Akkuratova str. 2

**Tel.:** +7(812)702-37-16

Printed by Typography Print24 LLC

5 Samoilova street, St. Petersburg

Manuscript submission and correspondence with authors,  
advertising and subscription —

**e-mail:** bulletin@almazovcentre.ru

**Subscription on catalogue of Rospechat agency: index 57996**

Archive: [http://www.almazovcentre.ru/?page\\_id=20396](http://www.almazovcentre.ru/?page_id=20396)

[http://elibrary.ru/title\\_about.asp?id=50986](http://elibrary.ru/title_about.asp?id=50986)

All rights reserved. © 2023.

Full or partial reproduction of materials printed in journal is allowed by the written permission of publisher.

*Editors accept no responsibility for the content of advertising materials.*

Published January 09, 2024

18+

## СОДЕРЖАНИЕ

## СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

472 Глушков Н. И., Пузряк П. Д., Звягинцева А. Н., Панасюк Э. И., Иванов М. А.

**ТРОМБОТИЧЕСКИЕ И ГЕМОМРАГИЧЕСКИЕ  
ОСЛОЖНЕНИЯ ПРИ COVID-19**

484 Нифонтов Е. М., Трусов И. С., Хачикян Т. Т., Бирюков А. В., Красичков А. С., Шаповалова Д. С., Сердюкова И. А.

**ВЛИЯНИЕ СУБКЛИНИЧЕСКОЙ ТИРЕОИДНОЙ  
ДИСФУНКЦИИ НА РЕМОДЕЛИРОВАНИЕ  
КОРОНАРНЫХ АРТЕРИЙ ПОСЛЕ СТЕНТИРОВАНИЯ  
ПРИ ОСТРОМ КОРОНАРНОМ СИНДРОМЕ  
БЕЗ ПОДЪЕМА СЕГМЕНТА ST**

## МЕДИЦИНСКАЯ ХИМИЯ

495 Павлюкова Ю. Н., Певзнер Л. М., Гукова П. А., Новожилова Д. Д., Данагулян Г. Г., Островский В. А.  
 **$\beta$ -(2R,3S,5R)-2-(ГИДРОКСИМЕТИЛ)-6-(5-ФЕНИЛ-  
2H-ТЕТРАЗОЛ-2-ИЛ) ТЕТРАГИДРО-2H-ПИРАН-3,4,5-  
ТРИОЛ. СИНТЕЗ И КОМПЬЮТЕРНЫЙ ПРОГНОЗ  
БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ**

507 Кукалия О. Н., Мещеряков А. А., Юрьев Г. О., Андоскин П. А., Семенов К. Н., Молчанов О. Е., Майстренко Д. Н., Мурын И. В., Шаройко В. В.  
**ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ  
ВОДОРАСТВОРИМЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ЛЕГКИХ  
ФУЛЛЕРЕНОВ В МЕДИЦИНЕ**

522 Чебуркин Ю. В., Шульмейстер Г. А., Бондаренко А. Б., Чистякова А. В., Королев Д. В.  
**РАЗРАБОТКА ПРОТОТИПА ТЕРАНОСТИЧЕСКОЙ  
СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ  
КРЕМНЕЗЕМА С ИММОБИЛИЗИРОВАННЫМИ  
ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМИ КРАСИТЕЛЯМИ И  
НАПРАВЛЯЮЩИМ ЛИГАНДОМ VEGF**

## ЭНДОКРИНОЛОГИЧЕСКИЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

535 Лисовский Д. А., Мамина Н. Ш., Дробленков А. В., Байрамов А. А., Бобков П. С., Фёдоров Н. А., Каронова Т. Л., Шабанов П. Д.

**МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ И БИОХИМИЧЕСКАЯ  
ХАРАКТЕРИСТИКА ОСТЕОГЕНЕЗА  
ПРИ МЕДИКАМЕНТОЗНОЙ ТЕРАПИИ  
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОСТЕОПОРОЗА**

## МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ И ГЕНЕТИКА

549 Богданов Д. С., Черкашин Д. В., Улятовский В. А., Шуленин К. С., Ефимов С. В., Мякошина Л. А., Буценко С. А.  
**ВЛИЯНИЕ ФАКТОРА ВОЗРАСТА И ПОЛИМОРФИЗМА  
ГЕНОВ ACE И PAI-1 НА ТЯЖЕСТЬ ТЕЧЕНИЯ НОВОЙ  
КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ (SARS-COV-2)**

557 Калинина О. В., Самбур Д. Б., Королева Е. Е., Головкин А. С.  
**РЫБЫ DANIO RERIO КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ  
ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ**

## НЕВРОЛОГИЯ И НЕЙРОХИРУРГИЯ

566 Шиленко Л. А., Карпов А. А., Веретенникова Е. И., Галагудза М. М.  
**РОЛЬ НЕЙРОВосПАЛЕНИЯ В ПАТОГЕНЕЗЕ ОТЕКА  
ГОЛОВНОГО МОЗГА И ГЕМОМРАГИЧЕСКОЙ  
ТРАНСФОРМАЦИИ ПРИ ИШЕМИЧЕСКОМ  
ИНСУЛЬТЕ: МЕХАНИЗМЫ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ  
МИШЕНИ**

581 Веснина А. А., Самочерных К. А., Семенютин В. Б.  
**ВЕРХНЕШЕЙНАЯ СИМПАТЭКТОМИЯ  
ПРИ НЕЙРОВАСКУЛЯРНОЙ ПАТОЛОГИИ**

## МЕТОДОЛОГИЧЕСКАЯ СТАТЬЯ

591 Волкова Н. И., Волков А. В.  
**ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ АНАЛИТИЧЕСКОЙ  
МЕДИЦИНЫ**

## CONTENT

## CARDIOVASCULAR MEDICINE

**472** Nikolay I. Glushkov, Petr D. Puzdryak, Anastasia N. Zvyagintseva, Eleonora I. Panasyuk, Michael A. Ivanov  
**THROMBOTIC AND HEMORRHAGIC COMPLICATIONS IN COVID-19**

**484** Evgeniy M. Nifontov, Ivan S. Trusov, Tatevik T. Khachikyan, Alexey V. Biryukov, Alexandr S. Krasichkov, Diana S. Shapovalova, Irina A. Serdiukova  
**THE INFLUENCE OF THYROID STATUS ON LONG-TERM COMPLICATIONS AFTER STENTING IN PATIENTS WITH ACUTE CORONARY SYNDROME WITHOUT ST-SEGMENT ELEVATION**

## MEDICINAL CHEMISTRY

**495** Yulia N. Pavlyukova, Leonid M. Pevzner, Polina A. Gukova, Darya D. Novozhilova, Gevorg G. Danagulyan, Vladimir A. Ostrovskii  
 **$\beta$ -(2R,3S,5R)-2-(HYDROXYMETHYL)-6-(5-PHENYL-2H-TETRAZOL-2-YL) TETRAHYDRO-2H-PYRAN-3,4,5-TRIOL. SYNTHESIS AND COMPUTER PREDICTION OF BIOLOGICAL ACTIVITY**

**507** Oleg N. Kukalia, Anatoly A. Meshcheryakov, Gleb O. Iurev, Pavel A. Andoskin, Konstantin N. Semenov, Oleg E. Molchanov, Dmitry N. Maistrenko, Igor V. Murin, Vladimir V. Sharoyko  
**PROSPECTS FOR THE APPLICATION OF WATER-SOLUBLE DERIVATIVES OF LIGHT FULLERENES IN MEDICINE**

**522** Yuri V. Cheburkin, Galina A. Shulmeister, Andrey B. Bondarenko, Anastasia V. Chistyakova, Dmitry V. Korolev  
**DEVELOPMENT OF A PROTOTYPE OF A THERANOSTIC SYSTEM BASED ON SILICA NANOPARTICLES WITH IMMOBILIZED FLUORESCENT DYES AND VEGF TARGETING LIGAND**

## METABOLIC DISEASES

**535** Dmitriy A. Lisovsky, Nailya Sh. Mamina, Andrey V. Droblenkov, Alekber A. Bairamov, Pavel S. Bobkov, Nikita A. Fedorov, Tatiana L. Karonova, Petr D. Shabanov  
**MORPHOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF OSTEOGENESIS DURING DRUG THERAPY OF EXPERIMENTAL OSTEOPOROSIS**

## MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

**549** Dmitry S. Bogdanov, Dmitry V. Cherkashin, Viktor A. Ulyatovskiy, Konstantin S. Shulenin, Semen V. Efimov, Liliya A. Myakoshina, Sergey A. Butsenko  
**INFLUENCE OF THE AGE FACTOR AND ACE AND PAI-1 GENE POLYMORPHISM ON THE SEVERITY OF THE NEW CORONAVIRUS INFECTION (SARS-COV-2)**

**557** Olga V. Kalinina, Darina B. Sambur, Elizaveta E. Koroleva, Aleksey S. Golovkin  
**ZEBRAFISH AS A MODEL FOR STUDING EXTRACELLULAR VESICLES**

## NEUROLOGY AND NEUROSURGERY

**566** Leonid A. Shilenko, Andrei A. Karpov, Elizaveta I. Veretennikova, Michael M. Galagoudza  
**THE ROLE OF NEURO-INFLAMMATORY IN THE PATHOGENESIS OF BRAIN EDEMA AND HEMORRHAGIC TRANSFORMATION IN ISCHEMIC STROKE: MECHANISMS AND THERAPEUTIC TARGETS**

**581** Anastasiia A. Vesnina, Konstantin A. Samochnykh, Vladimir B. Semenyutin  
**UPPER CERVICAL SYMPATHECTOMY IN NEUROVASCULAR PATHOLOGY**

## METHODICS

**591** Natalya I. Volkova, Andrey V. Volkov  
**BASIC CONCEPTS OF ANALYTICAL MEDICINE**

## ТРОМБОТИЧЕСКИЕ И ГЕМОРРАГИЧЕСКИЕ ОСЛОЖНЕНИЯ ПРИ COVID-19

Глушков Н. И., Пуздряк П. Д., Звягинцева А. Н., Панасюк Э. И.,  
Иванов М. А.

Федеральное государственное бюджетное образовательное  
учреждение высшего образования «Северо-Западный  
государственный медицинский университет  
имени И. И. Мечникова» Министерства здравоохранения  
Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

**Контактная информация:**

Звягинцева Анастасия Николаевна,  
ФГБОУ ВО «СЗГМУ им.  
И. И. Мечникова» Минздрава России,  
ул. Кирочная, д. 41, Санкт-Петербург,  
Россия, 191015.  
E-mail: a\_g\_u\_r\_b\_a\_s\_h@mail.ru

*Статья поступила в редакцию 25.05.2023  
и принята к печати 19.09.2023.*

### Резюме

**Введение.** Новая коронавирусная инфекция демонстрирует в ряде случаев нестандартные клинические проявления, неотъемлемой характеристикой которых остается склонность к тромботическим и геморрагическим осложнениям. **Цель.** Изучить предрасполагающие факторы развития тромботических и геморрагических осложнений у больных COVID-19. **Материалы и методы.** В основу работы легли наблюдения за 403 больными, находившимися в стационаре по поводу пневмонии вирусной этиологии (COVID-19). Проспективно проанализированы особенности течения заболевания, нюансы коморбидной патологии, маркеры воспаления и коагуляции в основной группе (75 человек), в которой регистрировались тромботические и геморрагические осложнения в сравнении с контролем (328 пациентов), где такого рода последствий не выявлено. **Результаты.** Не было выявлено достоверных различий между группами в отношении возраста и пола. В основной группе регистрировалось большее количество пациентов с избыточной массой тела в сравнении с контролем. Уровни СРБ, ферритина, D-димера у больных, не имеющих осложнений, достоверно реже выходили за пределы референсных значений. Среди осложнений регистрировались спонтанные гематомы, желудочно-кишечные кровотечения, острые нарушения мозгового кровообращения, острый инфаркт миокарда и венозные тромбозы. **Заключение.** У пациентов с тромботическими и геморрагическими осложнениями COVID-19 увеличивается уровень маркеров воспалительного процесса (СРБ, ферритин). Указанные негативные последствия наиболее характерны для лиц с хронической болезнью почек, тяжелым течением артериальной гипертензии, ХОБЛ и генерализованным атеросклеротическим процессом (перенесенный инфаркт миокарда, инсульт).

**Ключевые слова:** венозные тромбозы, новая коронавирусная инфекция, тромботические и геморрагические осложнения, COVID-19.

*Для цитирования:* Глушков Н.И., Пуздряк П.Д., Звягинцева А.Н. и др. Тромботические и геморрагические осложнения при COVID-19. Трансляционная медицина. 2023;10(6):472-483. DOI: 10.18705/2311-4495-2023-10-6-472-483. EDN: EQOFBI

## THROMBOTIC AND HEMORRHAGIC COMPLICATIONS IN COVID-19

Nikolay I. Glushkov, Petr D. Puzdryak, Anastasia N. Zvyagintseva,  
Eleonora I. Panasyuk, Michael A. Ivanov

North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov,  
Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Anastasia N. Zvyagintseva,  
North-Western State Medical University  
named after I. I. Mechnikov,  
Kirochnaya str., 41, Saint Petersburg, Russia,  
191015.  
E-mail: a\_g\_u\_r\_b\_a\_s\_h@mail.ru

Received 25 May 2023; accepted  
19 September 2023.

### Abstract

**Background.** In some cases, a new coronavirus infection demonstrates non-standard clinical manifestations, an integral characteristic of which is a tendency to thrombotic and hemorrhagic complication. **Objective.** To study the predisposing factors for the development of thrombotic and hemorrhagic complications in patients with COVID-19. **Design and methods.** The work was based on observations of 403 patients who were hospitalized for pneumonia of viral etiology (COVID-19). The features of comorbid pathology, markers of inflammation and coagulation, characteristics of the identified complications in the main group (75 people who had thrombotic and hemorrhagic complications) were prospectively collected in comparison with the control (328 patients), where no such consequences were detected. **Results.** There were no significant differences between the groups in terms of age and gender. In the main group, a large number of overweight patients were registered in comparison with the control. The levels of CRP, ferritin, and D-dimer in patients with complications significantly exceeded the reference values more often. Among the complications, spontaneous hematomas, gastrointestinal bleeding, acute cerebral circulatory disorders, acute myocardial infarction and venous thromboembolic complications were recorded. **Conclusion.** In patients with thrombotic and hemorrhagic complications of COVID-19, the level of markers of the inflammatory process (CRP, ferritin) increases. These negative consequences are most characteristic for patients with chronic kidney disease, severe hypertension, COPD and generalized atherosclerotic process (myocardial infarction, stroke).

**Key words:** COVID-19, new coronavirus infection, thrombotic and hemorrhagic complications, venous thromboembolic complications.

*For citation: Glushkov NI, Puzdryak PD, Zvyagintseva AN, et al. Thrombotic and hemorrhagic complications in COVID-19. Translyatsionnaya meditsina=Translational Medicine. 2023;10(6):472-483 (In Russ.) DOI: 10.18705/2311-4495-2023-10-6-472-483. EDN: EQOFBI*

**Список сокращений:** АГ II–III степени — артериальная гипертензия II–III степени, ВТЭО — венозные тромбоземболические осложнения, ДН — дыхательная недостаточность, ЖКК — желудочно-кишечное кровотечение, КТ — компьютерная томография, ОИМ — острый инфаркт миокарда, ОНМК — острое нарушение мозгового

кровообращения, ПАТ — периферический артериальный тромбоз, ПИКС — постинфарктный кардиосклероз, СД 2 типа — сахарный диабет 2 типа, СРБ — С-реактивный белок, ХБП — хроническая болезнь почек, ХОБЛ — хроническая обструктивная болезнь легких.

### Введение

Новая коронавирусная инфекция демонстрирует в ряде случаев нестандартные клинические проявления, неотъемлемой характеристикой которых остается склонность к тромботическим и геморрагическим осложнениям [1]. Генез вышеназванных неблагоприятных последствий COVID-19 остается неясным, а характеристики тромбогеморрагических последствий отличаются от сепсис-индуцированных изменений, классического ДВС-синдрома и тромботической микроангиопатии [2].

**Целью настоящего исследования** явилось изучение предрасполагающих факторов развития тромботических и геморрагических осложнений у больных COVID-19.

### Материалы и методы

В основу работы легли наблюдения за 403 больными, находившимися на стационарном лечении по поводу пневмонии вирусной этиологии (COVID-19). Проспективно проанализированы особенности течения заболевания в основной группе (75 человек), в которой регистрировались тромботические и геморрагические осложнения в сравнении с контролем (328 пациентов), где такого рода последствий не выявлено. Оценивались метаболические нарушения, особенности поражения легких по данным КТ, коморбидная патология, маркеры воспаления и коагуляции, результаты оказания помощи, особенности развития тромботических событий и геморрагий.

Критерии включения: госпитализация с диагнозом «COVID-19-ассоциированная пневмония»; среднетяжелое и тяжелое течение. Критерии исключения: отказ от участия в исследовании, необходимость в использовании антиагрегантной терапии.

Первичной конечной точкой явилась регистрация двух видов осложнений — кровотечение (кровоизлияние) и тромбоз венозных или артериальных сосудов.

Срок наблюдения за пациентами составил 2 месяца (60 дней) от первого дня болезни.

Низкомолекулярные гепарины в профилактических дозах были назначены всем госпитализированным пациентам с момента поступления и до выписки из стационара (при отсутствии высокого риска кровотечений).

При наличии показаний (среднетяжелая и тяжелая формы COVID-19, пневмония с дыхательной недостаточностью, признаки цитокинового шторма) пациентам назначались глюкокортико-

стероиды (метилпреднизолон или дексаметазон) в необходимых дозировках.

Диагностика хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) осуществлялась при помощи опросника (Chronic Airways Diseases, A Guide for Primary Care Physicians, 2005), где при наборе 17 и более баллов диагноз ХОБЛ вероятен.

Артериальная гипертензия анализировалась по рекомендациям международной классификации (ACC/AHA Hypertension Guidelines, 2017).

Диагноз «постинфарктный кардиосклероз» (ПИКС) устанавливался при наличии инфаркта миокарда в анамнезе и наличии рубцовых изменений на ЭКГ.

Диагноз сахарного диабета ставился в случае уровня гликированного гемоглобина более 6,5% или при получении пациентом соответствующего лечения.

Диагноз хронической болезни почек (ХБП) ставился на основе рекомендаций KDIGO (2013).

Расчет индекса массы тела был произведен по формуле: масса тела человека (в килограммах) делится на рост (в квадрате) человека (в метрах). В соответствии с рекомендациями ВОЗ результаты интерпретировались так: 18,5–25 — нормальная масса тела, от 25 — предожирение/ожирение.

Степень тяжести дыхательной недостаточности определялась по парциальному давлению кислорода (PaO<sub>2</sub>, мм рт. ст.) и сатурации (SaO<sub>2</sub>, %).

Референсные значения: уровень СРБ в норме составляет 0–5 мг/л, ферритин для мужчин старше 15 лет в норме составляет от 20 до 250 мкг/л, для женщин — от 10 до 120 мкг/л, референсные значения для D-димера: 0–0,55 мкг FEU/мл.

Более высокая встречаемость сопутствующих патологий в группе с осложненным течением может указывать на возможную роль данных состояний в подобном развитии заболевания (табл. 1).

**Статистика.** Статистическую обработку проводили с использованием программы StatTech v. 2.5.9 (разработчик — ООО «Статтех», Россия). Количественные показатели оценивались на предмет соответствия нормальному распределению с помощью критерия Шапиро-Уилка (при числе исследуемых менее 50) или критерия Колмогорова-Смирнова (при числе исследуемых более 50). При отсутствии нормального распределения количественные данные описывались с помощью медианы (Me) и нижнего и верхнего квартилей (Q1–Q3). Категориальные данные описывались с указанием абсолютных значений и процентных долей. Сравнение двух групп по количественному показателю, распределение которого отличалось от нормального, выполнялось с помощью U-кри-

Таблица 1. Течение COVID-19 у больных с коморбидными состояниями

Table 1. The course of COVID-19 in patients with comorbid conditions

Коморбидные состояния/ Comorbid states	Пациенты, перенесшие COVID-19 без осложнений/Patients who underwent COVID-19 without complications	Пациенты, перенесшие COVID-19 с осложнениями/ COVID-19 patients with complications	p
ХОБЛ, n (%) / COPD, n (%)	4 (1,2)	8 (10,7)	p < 0,05
Артериальная гипертензия II–III степени, n (%) / Arterial hypertension of II–III stage, n (%)	60 (18,3)	54 (72,0)	p < 0,001
ПИКС, n (%) / PICS, n (%)	4 (1,2)	8 (10,7)	p < 0,05
Сахарный диабет II типа, n (%) / DM-2, n (%)	43 (13,1)	21 (28,0)	p < 0,05
ОНМК в анамнезе, n (%) / Stroke in anamnesis, n (%)	14 (4,3)	12 (16,0)	p < 0,05
Ожирение, n (%) / Obesity, n (%)	32 (9,8)	28 (37,3)	p < 0,001
ХБП, n (%) / CKD, n (%)	12 (3,7)	28 (37,3)	p < 0,001

Примечание: ОНМК — острое нарушение мозгового кровообращения.

Note: COPD — chronic obstructive pulmonary disease; PICS — postinfarction cardiosclerosis; CKD — chronic kidney disease.

терия Манна-Уитни. Сравнение процентных долей при анализе четырехпольных таблиц сопряженности выполнялось с помощью критерия хи-квадрат Пирсона (при значениях ожидаемого явления более 10), точного критерия Фишера (при значениях ожидаемого явления менее 10).

### Результаты

Не было выявлено достоверных различий между группами в отношении возраста и пола. Более частая встречаемость сопутствующих болезней в группе с осложненным течением может указывать на возможную роль данных состояний в подобном развитии заболевания.

Ожидается в основной группе регистрировалось большее количество пациентов с избыточной массой тела в сравнении с контролем (37,3 % vs 9,8 % соответственно; p < 0,001).

Оправдан интерес исследователей к влиянию результатов КТ (компьютерная томография) легких на развитие осложнений COVID-19. В контрольной группе достоверно чаще встречались минимальные изменения по итогам упомянутой диагностики (КТ-1: 36,9 % vs 17,3 % соответственно; p < 0,05; рис. 1).

Ряд коморбидных состояний не могут не сказываться на развитии тромботических и гемор-

рагических осложнений: в выполненном исследовании в группе пациентов с осложнениями достоверно чаще регистрировался сахарный диабет, в том числе в стадии декомпенсации (38,0 % vs 13,1 % соответственно; p < 0,05); а также ПИКС (10,7 % vs 1,2 % соответственно; p < 0,05). Артериальная гипертензия II–III степени у пациентов без осложнений встречалась в 18,3 % случаев, а у лиц с осложнениями — в 72,0 % случаев, ХБП была зарегистрирована в 3,7 % у больных, перенесших COVID-19 без осложнений, а у пациентов с осложнениями — в 37,3 % случаев (p < 0,05).

Обращает на себя внимание значительная частота дыхательной недостаточности (ДН) I–II степени у наблюдавшихся лиц (с дыхательной недостаточностью столкнулись 129 пациентов: 1 степень ДН — 82,9 % среди всех пациентов, 2 степень ДН — 14,7 % среди всех пациентов, 3 степень ДН — 2,4 % пациентов. Среди них у 35,7 % (46 человек) выявлены осложнения COVID-19: ДН 1 степени — 73,9 % (34 человека), ДН 2 степени — 19,6 % (9 человек), ДН 3 степени — 6,5 % (3 человека). Без ДН упомянутые осложнения были зарегистрированы у 29 человек (p = 0,002).

Следует отметить, что наиболее высокая вероятность тромботических и геморрагических осложнений отмечена у больных с ХБП, артери-

альной гипертензией II–III степени, ХОБЛ, ПИКС и ОНМК в анамнезе (ОШ 15,688; 11,486; 9,672; 9,672; 4,272 соответственно; рис. 2).

Уровень СРБ у пациентов, не имеющих тромботических и геморрагических осложнений, выхо-

дил за пределы референсных значений в 62 % случаев и, в среднем, равнялся 20,8 мг/л. У больных с неосложненным течением COVID-19 уровень СРБ был повышен в 81,3 % случаев и, в среднем, был равен 94,4 мг/л ( $p < 0,05$ ) (табл. 2).

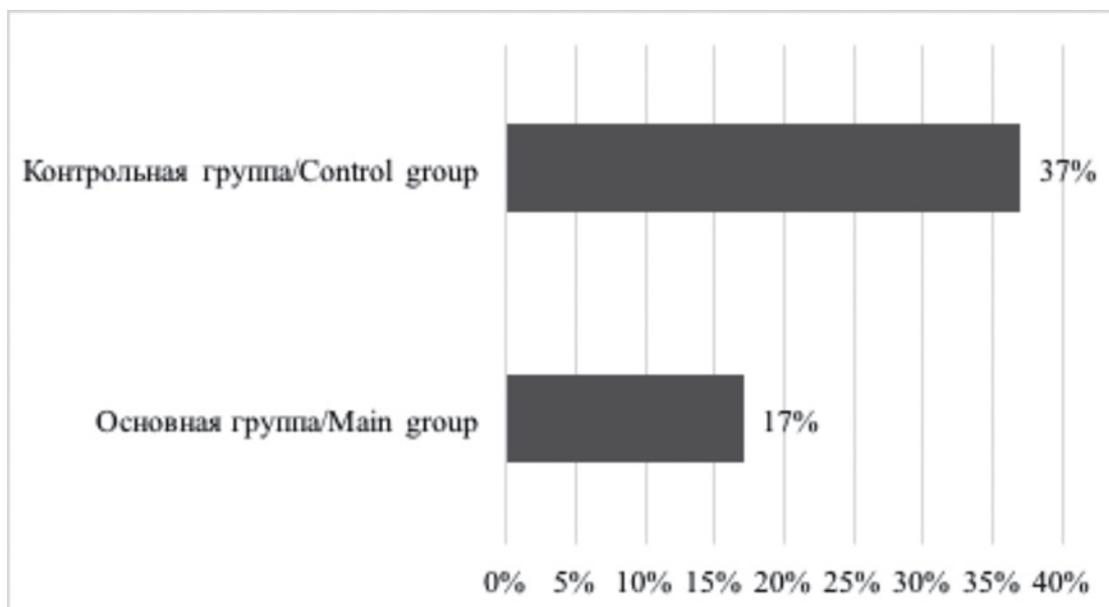


Рис. 1. Встречаемость изменений в легких КТ-1 в клинических группах

Figure 1. The incidence of changes in the lungs CT-1 in clinical groups

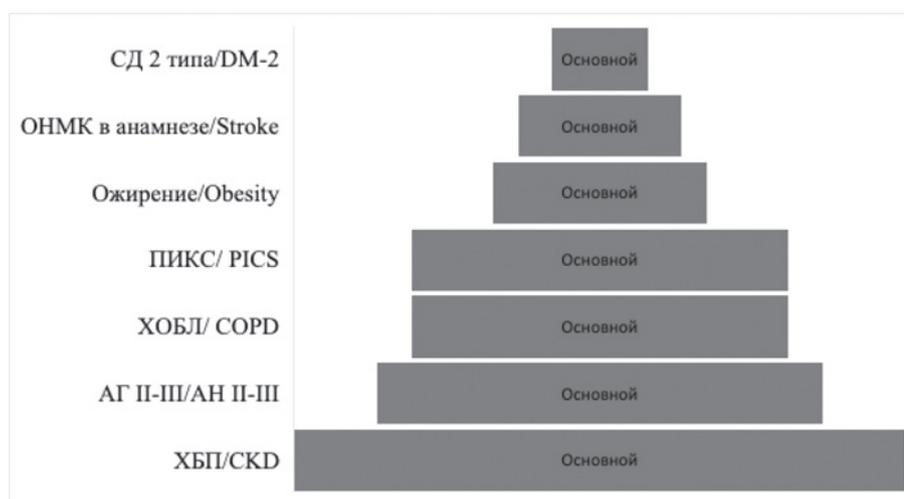


Рис. 2. Вероятность осложненного течения коронавирусной инфекции в зависимости от значения отношения шансов

Примечание: СД 2 типа — сахарный диабет 2 типа, АГ II–III степени — артериальная гипертензия II–III степени. По оси абсцисс представлено отношение шансов.

Figure 2. The probability of a complicated course of coronavirus infection, depending on the value of the odds ratio

Note: DM-2 — type 2 diabetes mellitus, AH II–III — grade II–III hypertension. The x-axis represents the odds ratio.

**Таблица 2. Частота превышения референсных значений и средний уровень С-реактивного белка у лиц с осложнениями и без них**

**Table 2. Frequency of exceeding the reference values and the average level C-reactive protein in individuals with and without complications**

Уровень СРБ/ C-reactive protein level	Пациенты, перенесшие COVID-19 без осложнений/ Patients who underwent COVID-19 without complications	Пациенты, перенесшие COVID-19 с осложнениями/ COVID-19 patients with complications	P
Частота повышения СРБ/ Frequency of CRP increase	62 %	81,3 %	p < 0,05
Средний уровень СРБ/ Average CRP level	20,8 мг/л/mg/l	94,4 мг/л/mg/l	p < 0,05

**Таблица 3. Частота превышения референсных значений и средний уровень ферритина у лиц с осложнениями и без них**

**Table 3. Frequency of exceeding the reference values and the average level ferritin in individuals with and without complications**

Уровень ферритина/ Ferritin level	Пациенты, перенесшие COVID-19 без осложнений/ Patients who underwent COVID-19 without complications	Пациенты, перенесшие COVID-19 с осложнениями/ COVID-19 patients with complications	P
Частота повышения ферритина/ Frequency of ferritin increase	59 %	87 %	p < 0,001
Средний уровень ферритина/ Average ferritin level	284 мкг/л/mcg/l	544 мкг/л/mcg/l	p < 0,05

Уровень ферритина у пациентов без тромботических и геморрагических осложнений повышался в 59 % случаев и, в среднем, был равен 284 мкг/л, а у лиц с осложнениями данный показатель в 87 % случаев выходил за пределы референсных значений и, в среднем, был равен 544 мкг/л (p < 0,05) (табл. 3).

Более высокий уровень острофазных белков в группе с осложненным течением может указывать на роль воспаления в подобном развитии патологического процесса.

D-димер выходил за пределы референсных значений у пациентов без тромботических и геморрагических осложнений в 29 % случаев и, в среднем, равнялся 0,34 мкг/мл, а у больных с осложнениями повышение D-димера наблюдалось в 75 % случаев и, в среднем, было равно 0,82 мкг/мл (p < 0,05) (табл. 4).

Среди пациентов основной группы частота различных тромботических и геморрагических осложнений не была одинакова: чаще других регистрировались спонтанные гематомы, желудочно-кишечные кровотечения, острые нарушения мозгового кровообращения, инфаркт миокарда и венозные тромбоэмболические осложнения (рис. 3).

Локализация спонтанных гематом также различалась: абдоминальные, на уровне грудной и передней брюшной стенки, конечностей. (рис. 4, 5).

Желудочно-кишечные кровотечения возникали на фоне острых язв и эрозий проксимальных сегментов пищеварительного тракта.

Инфаркт миокарда, инсульт и периферический артериальный тромбоз характеризовались высокой летальностью (12,5 %, 16,7 % и 16,7 % соответственно), но максимальное количество неу-

довлетворительных исходов наблюдалось на фоне венозных тромбэмболических осложнений (25,0 % — ВТЭО). На втором месте по частоте отмечались летальные исходы на фоне ЖКК (20,8 %). Чуть реже негативные последствия наблюдались при мезентериальном тромбозе (12,3 %; рис. 6). При этом особенно примечателен тот факт, что

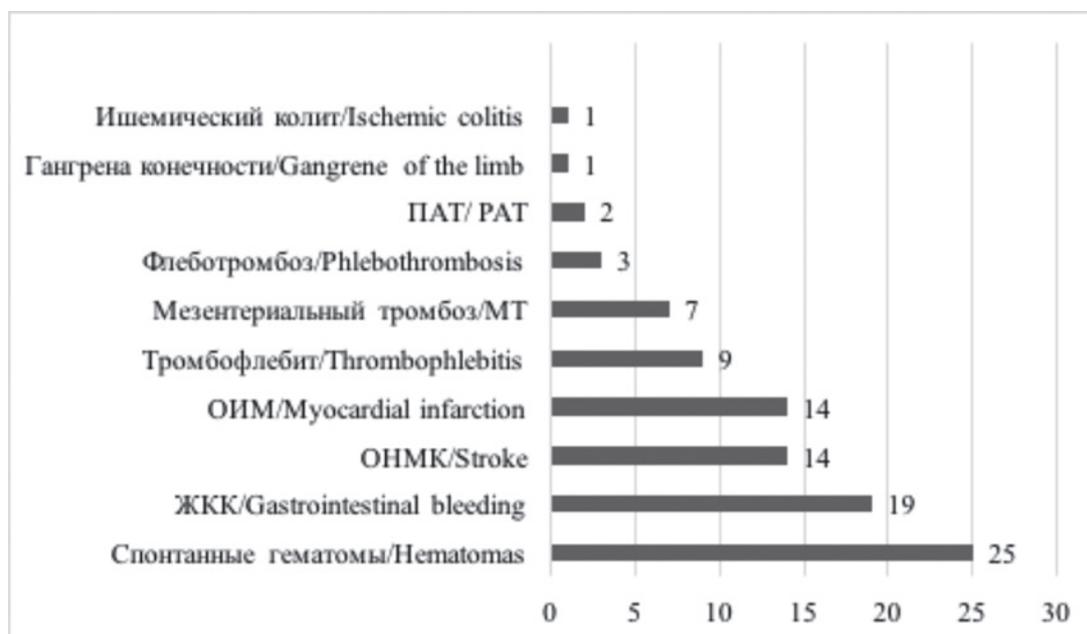
если на фоне ВТЭО погибал каждый четвертый пациент, то при отсутствии тромботических и геморрагических осложнений отмечалась нулевая летальность.

В ряде наблюдений первоначально развивались геморрагические осложнения, а потом регистрировались тромбозы (и наоборот; рис. 7).

**Таблица 4. Частота превышения референсных значений и средний уровень D-димера у лиц с осложнениями и без них**

**Table 4. Frequency of exceeding the reference values and the average level D-dimer in individuals with and without complications**

Уровень D-димера/ D-dimer level	Пациенты, перенесшие COVID-19 без осложнений/ Patients who underwent COVID-19 without complications	Пациенты, перенесшие COVID-19 с осложнениями/ COVID-19 patients with complications	p
Частота повышения D-димера/ D-dimer boost frequency	29 %	75 %	p < 0,001
Средний уровень D-димера/ Middle level D-dimer	0,34 мкг/мл/mcg/ml	0,82 мкг/мл/mcg/ml	p < 0,05



**Рис. 3. Частота тромботических и геморрагических осложнений**

Примечание: ПАТ — периферический артериальный тромбоз, ОИМ — острый инфаркт миокарда, ОНМК — острое нарушение мозгового кровообращения, ЖКК — желудочно-кишечное кровотечение. По оси абсцисс — количество пациентов с тромботическими и геморрагическими осложнениями.

**Figure 3. Frequency of thrombotic and hemorrhagic complications**

Note: PAT — peripheral arterial thrombosis, MT — mesenteric thrombosis. The x-axis represents the number of patients with thrombotic and hemorrhagic complications.



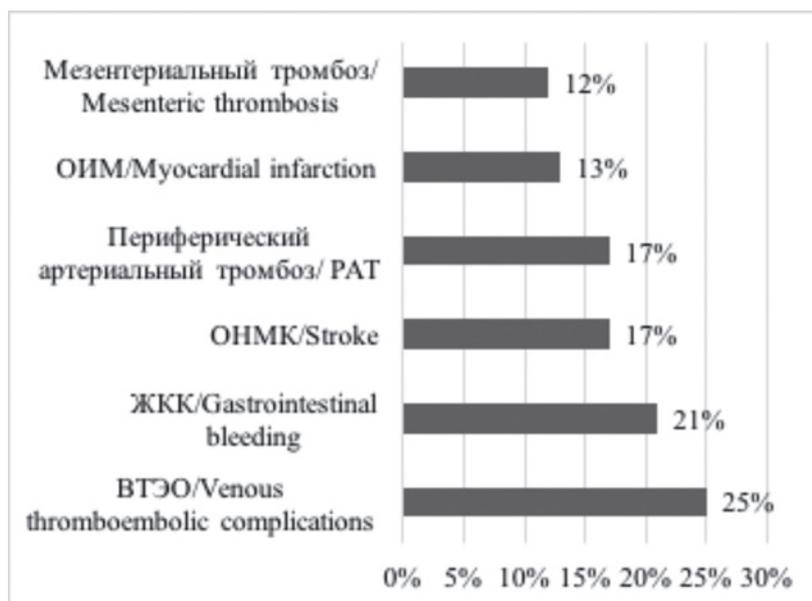
**Рис. 4. Спонтанная гематома правого бедра и голени**

**Figure 4. Spontaneous hematoma of the right thigh and lower leg**



**Рис. 5. Компьютерная томография: спонтанная гематома на уровне мышц передней брюшной стенки**

**Figure 5. Computed tomography: spontaneous hematoma at the level of the muscles of the anterior abdominal wall**



**Рис. 6. Частота и причины летальных исходов у больных с осложненным течением новой коронавирусной инфекции**

Примечание: ОИМ — острый инфаркт миокарда, ОНМК — острое нарушение мозгового кровообращения, ЖКК — желудочно-кишечное кровотечение, ВТЭО — венозные тромбоэмболические осложнения.

**Figure 6. Frequency and causes of death in patients with complicated course of a new coronavirus infection**



**Рис. 7. Спонтанная гематома бедра и голени с последующим развитием периферического артериального тромбоза**

**Figure 7. Spontaneous hematoma of the thigh and lower leg with subsequent development of peripheral arterial thrombosis**

#### Обсуждение

Гендерные особенности сказываются на частоте тромботических событий [3]. Женский пол характеризуется гормонально обусловленным механизмом иммуномодуляции, что приводит к сни-

жению числа негативных последствий COVID-19 [4]. Тяжесть течения коронавирусной инфекции и высокая вероятность развития осложнений характерна для лиц мужского пола [5]. По итогам выполненного исследования не было отмечено

гендерных различий между группами: и в основной группе, и в контроле женщины составили 54 % анализируемых больных.

Возрастные особенности также накладывают отпечаток на характер течения коронавирусной инфекции: большая часть больных с артериальными тромбозами — это пожилые люди. Данное обстоятельство связано с возрастанием концентрации факторов коагуляции у лиц пожилого и старческого возраста (это касается фибриногена, фактора фон Виллебранда) [6]. В выполненном исследовании лица пожилого и старческого возраста составляли 53 % и 64 % в контроле и в основной группе соответственно ( $p > 0,05$ ).

Ожирение традиционно рассматривается как фактор риска тромботических неблагоприятных кардиоваскулярных событий [2]. Влияние массы тела на вероятность развития вышеуказанных негативных последствий COVID-19 обусловлено выбросом провоспалительных цитокинов на фоне хронизации воспалительного процесса у пациентов с ожирением, что объясняет сроки развития тромботических осложнений у лиц с коронавирусной инфекцией [7]. В вышеуказанном исследовании наличие ожирения также ассоциировалось с осложненным течением COVID-19. При этом тромботические осложнения чаще встречались у лиц с высокой массой тела и на фоне абдоминального ожирения.

Тяжесть течения коронавирусной инфекции влияет на вероятность развития микротромбов по причине активации тромбоцитов [8]. Доказана также роль нейтрофилов в процессе тромбообразования на фоне воспалительного процесса, а также эффективность фибринолитиков в случае тромботических осложнений COVID-19 [9]. В то же время известно влияние нейтрофилов на повреждение эндотелия при воздействии вирусного патогена, что приводит к развитию кровотечений, ассоциированных с тяжелым течением COVID-19 [1]. Осуществленное исследование также показало увеличение частоты тромботических и геморрагических осложнений у больных с тяжелым течением COVID-19; вариант поражения легких КТ-1 достоверно чаще встречается в контроле.

Для сахарного диабета характерно нарушение артериального кровообращения. Данное обстоятельство во многом связано с изменением вязкости крови [10]. Повышение вязкости и соответствующее повреждение кровотока влияет на частоту тромботических осложнений и ишемических последствий [11]. Выполненное исследование показало, что сахарный диабет как в компенсированном, так и в декомпенсированном вариантах может су-

щественным образом влиять на частоту тромботических и геморрагических осложнений.

Другие коморбидные состояния также сказываются на течении коронавирусной инфекции. Это в полной мере касается ишемической болезни сердца и последствий перенесенного инфаркта миокарда, потенцирующих негативные последствия COVID-19 [12]. Механизм влияния указанных патологических состояний связан с эндотелиальной дисфункцией на фоне генерализованного атеросклероза и компонентов метаболического синдрома, в том числе дислипидемии. Поскольку SARS-CoV-2 влияет на эндотелий, то больные с эндотелиопатией более чувствительны к воздействию коронавирусной инфекции, что реализуется в виде неблагоприятных кардиоваскулярных событий тромботического плана [13]. В осуществленном исследовании у больных основной группы достоверно чаще регистрировался ПИКС.

По данным литературы, пациенты с артериальной гипертензией значительно чаще страдают от различных осложнений, включая дыхательную недостаточность (60,8 % против 39,5 %), сердечную недостаточность (9,9 % против 3,1 %), острую почечную недостаточность (25,3 % против 7,3 %), пневмонию (90,6 % против 86 %), сепсис (14,7 % против 7,5 %) и кровотечения (3,6 % против 1,6 %). Летальность при этом составляет 29,6 % у больных с сопутствующей артериальной гипертензией и 11,3 % без артериальной гипертензии ( $p < 0,001$ ) [14]. В настоящем исследовании пациенты с артериальной гипертензией достоверно чаще сталкивались с осложненным течением (18,3 % vs 72,0 %,  $p < 0,001$ ).

Чем тяжелее протекает COVID-19, тем выше риск поражения почек, что ухудшает прогноз. SARS-CoV-2 вызывает острое повреждение почек; патогенез неизвестен, но исследователи полагают, что коронавирусная инфекция прямо или косвенно влияет на почки [15]. Эти данные соответствуют результатам настоящего исследования, согласно которым осложненное течение коронавирусной инфекции достоверно чаще регистрировалось на фоне хронической болезни почек ( $p < 0,001$ ).

Пациенты с ХОБЛ подвержены более высокому риску тяжелого течения COVID-19 по сравнению с лицами без ХОБЛ [16]. В выполненном исследовании у пациентов с ХОБЛ осложнения регистрировались достоверно чаще, чем без упомянутого заболевания (10,7 vs 1,2 соответственно,  $p < 0,05$ ).

Свойственная коронавирусной инфекции коагулопатия воспалительного генеза, характеризующаяся увеличением уровня фибриногена и СРБ, сочетается с повышением уровня D-димера и так

называемым аномальным фибринолизом, что отличает COVID-19 от неспецифических септических процессов [17]. В свою очередь, гиперкоагуляция с повышением уровня маркеров воспаления и прокоагулянтных факторов повреждает эндогенную фибринолитическую систему и влияет на активность тромбоцитов, что отражается на частоте геморрагических событий [18]. Осуществленное исследование продемонстрировало достоверные различия между анализируемыми группами в отношении маркеров воспаления (СРБ, ферритин) и показателей тромбообразования (D-димер).

Вовлечение в тромботический процесс различных сосудистых бассейнов следует отнести к индивидуальным региональным различиям в артериальной и венозной тромбогенности [19].

### Выводы

У пациентов с тромботическими и геморрагическими осложнениями COVID-19 увеличивается уровень маркеров воспалительного процесса (СРБ, ферритин).

Указанные негативные последствия наиболее характерны для лиц с хронической болезнью почек, тяжелым течением артериальной гипертензии, ХОБЛ и генерализованным атеросклеротическим процессом (перенесенный инфаркт миокарда, ОНМК).

Ограничением настоящего исследования следует считать отсутствие информации об отдаленных последствиях у анализируемых пациентов.

### Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциально-го конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

### Список литературы / References

1. Narasaraaju T, Tang BM, Herrmann M, et al. Neutrophilia and NETopathy as Key Pathologic Drivers of Progressive Lung Impairment in Patients With COVID-19. *Front Pharmacol.* 2020;11:870. DOI: 10.3389/fphar.2020.00870.
2. Gülsen A, Yigitbas BA, Uslu B, et al. The Effect of Smoking on COVID-19 Symptom Severity: Systematic Review and Meta-Analysis. *Pulm Med.* 2020;2020:7590207. DOI: 10.1155/2020/7590207.
3. Glushkov NI, Ivanov MA, Bondarenko PB, et al. Gender features of peripheral atherosclerosis: the role of metabolic groups. *Profilakticheskaya i klinicheskaya medicina = Preventive and clinical medicine.* 2018; 66(1):57–64. In Russian [Глушков Н.И., Иванов М.А., Бондаренко П.Б. и др. Гендерные особенности периферического атеросклероза: роль метаболических нару-

шений. *Профилактическая и клиническая медицина.* 2018; 66(1):57–64].

4. Fairweather D. Sex differences in inflammation during atherosclerosis. *Clin Med Insights Cardiol.* 2015; 8(Suppl 3):49–59. DOI: 10.4137/CMC.S17068.

5. Meng Y, Wu P, Lu W, et al. Sex-specific clinical characteristics and prognosis of coronavirus disease-19 infection in Wuhan, China: A retrospective study of 168 severe patients. *PLoS Pathog.* 2020; 16(4):e1008520. DOI: 10.1371/journal.ppat.1008520.

6. Favaloro EJ, Franchini M, Lippi G. Aging hemostasis: changes to laboratory markers of hemostasis as we age — a narrative review. *Semin Thromb Hemost.* 2014; 40(6):621–33. DOI: 10.1055/s-0034-13846316.

7. Bautista LE, Vera LM, Arenas IA, et al. Independent association between inflammatory markers (C-reactive protein, interleukin-6, and TNF-alpha) and essential hypertension. *J Hum Hypertens.* 2005; 19(2):149–154. DOI: 10.1038/sj.jhh.1001785.

8. Leppkes M, Knopf J, Naschberger E, et al. Vascular occlusion by neutrophil extracellular traps in COVID-19. *EBioMedicine.* 2020; 58:102925. DOI: 10.1016/j.ebiom.2020.102925.

9. Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat Rev Immunol.* 2018; 18(2):134–147. DOI: 10.1038/nri.2017.105.

10. Glushkov NI, Ivanov MA, Apresyan AY, et al. Influence of the metabolic syndrome on the results of the reconstructions in patients with infrainguinal artery disease. *HERALD of North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov.* 2018; 10(3):54–59. In Russian [Глушков Н.И., Иванов М.А., Апресян А.Ю. и др. Влияние метаболического синдрома на исходы реконструкций у больных с инфраингвинальной артериальной болезнью. *Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И. И. Мечникова.* 2018; 10(3):54–59]. DOI: 10.17816/mechnikov201810354-59.

11. Fabrichnova AA, Kulikov DA, Misnikova IV, et al. Changes in the rheological properties of blood in diabetes mellitus. *Endocrinology: News, Opinions, Training.* 2018; 23(2):26–34. In Russian [Фабричнова А.А., Куликов Д.А., Мисникова И.В. и др. Изменения реологических свойств крови при сахарном диабете. *Эндокринология. Новости. Мнения. Обучение.* 2018; 23(2):26–34]. DOI: 10.24411/2304-9529-2018-12002.

12. Wang X, Fang X, Cai Z, et al. Comorbid Chronic Diseases and Acute Organ Injuries Are Strongly Correlated with Disease Severity and Mortality among COVID-19 Patients: A Systemic Review and Meta-Analysis. *Research (Wash D C).* 2020; 2020:2402961. DOI: 10.34133/2020/2402961.

13. Piché ME, Lemieux S, Weisnagel SJ, et al. Relation of high-sensitivity C-reactive protein, interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha, and fibrinogen to abdominal adipose

tissue, blood pressure, and cholesterol and triglyceride levels in healthy postmenopausal women. *Am J Cardiol.* 2005; 96(1):92–97. DOI: 10.1016/j.amjcard.2005.02.051.

14. El-Battrawy I, Nuñez-Gil IJ, Abumayyah M, et al. COVID-19 and the impact of arterial hypertension—An analysis of the international HOPE COVID-19 Registry (Italy-Spain-Germany). *Eur J Clin Invest.* 2021; 51(11):e13582. DOI: 10.1111/eci.13582.

15. Mohamadi Yarijani Z, Najafi H. Kidney injury in COVID-19 patients, drug development and their renal complications: Review study. *Biomed Pharmacother.* 2021; 142:111966. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111966.

16. Alqahtani JS, Oyelade T, Aldhahir AM, et al. Prevalence, Severity and Mortality associated with COPD and Smoking in patients with COVID-19: A Rapid Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One.* 2020; 15(5):e0233147. DOI: 10.1371/journal.pone.0233147.

17. Aghayari Sheikh Neshin S, Shahjouei S, Koza E, et al. Stroke in SARS-CoV-2 Infection: A Pictorial Overview of the Pathoetiology. *Front Cardiovasc Med.* 2021; 8:649922. DOI: 10.3389/fcvm.2021.649922.

18. Gharacholou SM, Becker RC. Hemostasis and thrombosis in older adults. *J Thromb Thrombolysis.* 2009; 27(2):249–251. DOI: 10.1007/s11239-009-0308-4.

19. Karnicki K, Komorowicz E, Fass DN, et al. Influence of anatomical location on arterial thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22(2):342–347. DOI: 10.1161/hq0202.103999.

#### Информация об авторах:

Глушков Николай Иванович, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой общей хирургии, ФГБОУ ВО «СЗГМУ им. И. И. Мечникова» Минздрава России;

Пуздряк Петр Дмитриевич, аспирант кафедры общей хирургии, ФГБОУ ВО «СЗГМУ им. И. И. Мечникова» Минздрава России;

Звягинцева Анастасия Николаевна, студент ФГБОУ ВО «СЗГМУ им. И. И. Мечникова» Минздрава России;

Панасюк Элеонора Ивановна, аспирант кафедры общей хирургии, ФГБОУ ВО «СЗГМУ им. И. И. Мечникова» Минздрава России;

Иванов Михаил Анатольевич, д.м.н., профессор кафедры общей хирургии, ФГБОУ ВО «СЗГМУ им. И. И. Мечникова» Минздрава России.

#### Authors information:

Nikolay I. Glushkov, D.M.Sc., Professor, head of the Department of General surgery, North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov;

Petr D. Puzdriak, Post-graduate student, Department of General surgery, North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov;

Anastasia N. Zvyagintseva, student, medical faculty; North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov;

Eleonora I. Panasyuk, Post-graduate student, Department of General surgery, North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov;

Michael A. Ivanov, D.M.Sc., Professor, Department of General surgery, North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov.

## ВЛИЯНИЕ СУБКЛИНИЧЕСКОЙ ТИРЕОИДНОЙ ДИСФУНКЦИИ НА РЕМОДЕЛИРОВАНИЕ КОРОНАРНЫХ АРТЕРИЙ ПОСЛЕ СТЕНТИРОВАНИЯ ПРИ ОСТРОМ КОРОНАРНОМ СИНДРОМЕ БЕЗ ПОДЪЕМА СЕГМЕНТА ST

Нифонтов Е. М.<sup>1</sup>, Трусов И. С.<sup>1</sup>, Хачикян Т. Т.<sup>1</sup>, Бирюков А. В.<sup>1</sup>,  
Красичков А. С.<sup>1,2</sup>, Шаповалова Д. С.<sup>1</sup>, Сердюкова И. А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет «ЛЭТИ» имени В. И. Ульянова (Ленина), Санкт-Петербург, Россия

### Контактная информация:

Трусов Иван Сергеевич,  
ФГБОУ ВО ПСПбГМУ  
им. ак. И. П. Павлова Минздрава России,  
ул. Льва Толстого, 6–8, Санкт-Петербург,  
Россия, 197022.  
E-mail: dr.getsuga@gmail.com

Статья поступила в редакцию 15.11.2023  
и принята к печати 19.12.2023.

### Резюме

**Актуальность.** Известно, что как субклинический гипотиреоз (СГТ), так и субклинический тиреотоксикоз (СТТ) могут влиять на исходы ишемической болезни сердца. Целесообразность рутинного определения тиреоидного статуса у пациентов, не имеющих очевидных признаков тиреоидной дисфункции, при остром коронарном синдроме без подъема сегмента ST (ОКСбпST) для оценки влияния на состояние имплантированных стентов не доказана. **Цель.** Оценить влияние субклинического гипотиреоза и субклинического тиреотоксикоза на потерю просвета и степень эндотелизации стентов с лекарственным покрытием после стентирования по поводу ОКСбпST. **Материалы и методы.** В исследование включено 173 пациента, экстренно стентированных по поводу ОКСбпST, которым в дальнейшем в течение года выполнялось повторное коронарографическое исследование в плановом или экстренном порядке с прицельной оценкой состояния установленных стентов. У 40 больных с эверолимус-покрытыми стентами через  $6,3 \pm 0,3$  месяца после стентирования оценивалось состояние коронарных артерий методом оптической когерентной томографии (ОКТ). У всех включенных в исследование лиц оценивался тиреоидный статус. **Результаты.** СГТ выявлен у 8 (21,6 %) пациентов с потерей просвета в зоне стента и у 26 (19,1 %) — без потери просвета,  $p = 0,73$ . СТТ выявлен соответственно у 2 (5,4 %) и 3 (2,2 %) пациентов,  $p = 0,30$ . Прогностический анализ, выполненный методом логистической регрессии с принудительным включением ряда показателей в качестве предикторов потери просвета, выделил параметры Syntax Score I, диаметр стента, количество пораженных коронарных артерий. Влияния тиреоидного статуса на потерю просвета не обнаружено. У пациентов с субклиническим гипотиреозом по данным ОКТ выявлена недостаточная эндотелизация эверолимус-покрытых стентов через 6 месяцев после стентирования по поводу ОКСбпST. Процент непокрытых страт стента зависел от уровня ТТГ ( $r = 0,42$ ,  $p = 0,007$ ). Чем выше был уровень ТТГ, тем выше был показатель индекса заживления и тем хуже была эндотелизация стента ( $r = 0,37$ ,  $p = 0,016$ ). **Заключение.** Таким образом, рутинное определение показателей тиреоидного статуса у больных с ОКСбпST с целью выявления

субклинической тиреоидной дисфункции не позволяет получить значимой прогностической информации относительно риска потери просвета имплантированных стентов. Учитывая потенциальный риск тромботических осложнений, ассоциированных с недостаточной эндотелизацией эверолиму-покрытых стентов при наличии субклинического гипотиреоза, по-видимому, целесообразно его выявление при решении вопроса о деэскалации антитромботической терапии. Остается открытым вопрос о необходимости коррекции параметров субклинической тиреоидной дисфункции с целью модификации прогноза.

**Ключевые слова:** ОКСбпСТ, оптическая когерентная томография, потеря просвета, реваскуляризация, субклинический гипертиреоз, субклинический гипотиреоз, ТТГ.

*Для цитирования:* Нифонтов Е.М., Трусов И.С., Хачикян Т.Т. и др. Влияние субклинической тиреоидной дисфункции на ремоделирование коронарных артерий после стентирования при остром коронарном синдроме без подъема сегмента ST. Трансляционная медицина. 2023;10(6):484-494. DOI: 10.18705/2311-4495-2023-10-6-484-494. EDN: EQPNGU

## THE INFLUENCE OF THYROID STATUS ON LONG-TERM COMPLICATIONS AFTER STENTING IN PATIENTS WITH ACUTE CORONARY SYNDROME WITHOUT ST-SEGMENT ELEVATION

Evgeniy M. Nifontov<sup>1</sup>, Ivan S. Trusov<sup>1</sup>, Tatevik T. Khachikyan<sup>1</sup>,  
Alexey V. Biryukov<sup>1</sup>, Alexandr S. Krasichkov<sup>1,2</sup>,  
Diana S. Shapovalova<sup>1</sup>, Irina A. Serdiukova<sup>2</sup>

**Corresponding author:**

Ivan S. Trusov,  
Academician I. P. Pavlov First Saint  
Petersburg State Medical University,  
Lyva Tolstogo str., 6–8, Saint Petersburg,  
Russia, 197022.  
E-mail: dr.getsuga@gmail.com

<sup>1</sup> Academician I. P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical  
University, Saint Petersburg, Russia

<sup>2</sup> Saint Petersburg Electrotechnical University “LETI”, Saint Petersburg,  
Russia

Received 15 November 2023; accepted  
19 December 2023.

### Abstract

**Background.** It is known that both subclinical hypothyroidism (SHT) and subclinical thyrotoxicosis (STT) can influence the outcome of coronary heart disease. The feasibility of routinely determining thyroid status in patients without obvious signs of thyroid dysfunction with acute coronary syndrome without ST-segment elevation (NSTEACS) to assess the effect on the status of implanted stents has not been determined. **Objective.** To evaluate the effect of subclinical hypothyroidism and subclinical thyrotoxicosis on lumen loss and the degree of endothelialization of drug-eluting stents after stenting for NSTE-ACS. **Design and methods.** The study included 173 patients who were urgently stented for NSTE-ACS, and who subsequently underwent repeat coronary angiography within a year on a planned or emergency basis with a targeted assessment of the condition of the installed stents. In 40 patients with everolimus-eluting stents, the condition of the coronary arteries was assessed 6.3 + 0.3 months after stenting using optical coherence tomography (OCT). All patients included in the study had their thyroid status assessed. **Results.** SHT was detected in 8 (21.6 %) patients with loss of lumen in the stent area and in 26 (19.1 %) patients without loss of lumen,  $p = 0.73$ . STT was detected in 2 (5.4 %) and 3 (2.2 %) patients, respectively,  $p = 0.30$ . A prognostic analysis performed by logistic regression with forced inclusion as predictors of lumen loss identified the parameters Syntax Score I, stent diameter, and the number of affected coronary arteries. No effect of thyroid status on lumen loss was found. In patients with subclinical hypothyroidism, OCT data revealed insufficient endothelialization of everolimus-eluting stents 6 months after stenting for

NSTE-ACS. The percentage of uncovered stent struts depended on TSH levels ( $r = 0.42$ ,  $p = 0.007$ ). The higher the TSH level, the higher the healing index and the worse the stent endothelialization ( $r = 0.37$ ,  $p = 0.016$ ). **Conclusion.** Thus, routine determination of thyroid status indicators in patients with NSTE-ACS in order to identify subclinical thyroid dysfunction does not provide significant prognostic information regarding the risk of lumen loss of implanted stents. Considering the potential risk of thrombotic complications associated with insufficient endothelialization of everolimus-eluting stents in the presence of subclinical hypothyroidism, it seems advisable to identify it when deciding on de-escalation of antithrombotic therapy. The question remains open about the need to correct the parameters of subclinical thyroid dysfunction in order to modify the prognosis.

**Key words:** lumen loss, NSTE-ACS, optical coherence tomography, revascularization, subclinical hyperthyroidism, subclinical hypothyroidism, TSH.

*For citation: Nifontov EM, Trusov IS, Khachikyan TT, et al. The influence of thyroid status on long-term complications after stenting in patients with acute coronary syndrome without ST-segment elevation. Translyatsionnaya meditsina=Translational Medicine. 2023;10(6):484-494 (In Russ.) DOI: 10.18705/2311-4495-2023-10-6-484-494. EDN: EQPNGU*

**Список сокращений:** ИЗ — индекс заживления, ОКСбпСТ — острый коронарный синдром без подъема сегмента ST, ОКСпСТ — острый коронарный синдром с подъемом сегмента ST, ОКТ — оптическая когерентная томография, СГТ — субклинический гипотиреоз, ССЗ — сердечно-сосудистые заболевания, СТТ — субклинический тиреотоксикоз, ТТГ — тиреотропный гормон, ЧКВ — чрескожное коронарное вмешательство.

### Введение

Несмотря на значительный прогресс в лечении острого коронарного синдрома (ОКС), обусловленный внедрением эффективных алгоритмов экстренной помощи и, прежде всего, применением своевременной реваскуляризации миокарда, остаточный риск развития неблагоприятных исходов сохраняется на недопустимо высоком уровне [1, 2]. Примечательно, что неблагоприятные события у лиц, перенесших ОКСбпСТ в течение ближайшего года, развиваются чаще, чем при ОКСпСТ [2, 3]. Снижению риска повторных коронарных событий способствует использование современных типов стентов. Между тем, несмотря на модификацию платформ и антипролиферативных покрытий стентов, сохраняется риск повторных неблагоприятных коронарных событий.

Существует множество факторов, влияющих на риск развития поздних осложнений коронарных вмешательств, в частности тип установленного стента, особенности оперативного вмешательства на коронарных артериях (сложные бифуркационные стентирования, установка нескольких стентов одновременно, открытие хронических окклюзий,

неполное расправление стентов), а также сопутствующие заболевания пациентов, например, хроническая сердечная недостаточность, хроническая болезнь почек и др. [4, 5]. Несомненно, важно выявлять известные сопутствующие заболевания и состояния, нарушающие процессы формирования неоинтимы [6], а также искать новые предикторы потери просвета коронарных артерий и оценивать степень их влияния на исходы стентирования.

Потенциальным и пока малоизученным фактором риска неблагоприятных исходов коронарного стентирования является патология тиреоидного статуса пациента. Известно, что гипотиреоз приводит к увеличению риска сердечно-сосудистых осложнений, поскольку ассоциирован с повышением уровня холестерина липопротеинов низкой плотности и триглицеридов. У пациентов с гипотиреозом также чаще встречается многососудистое поражение коронарного русла [7]. Как гипертиреоз, так и гипотиреоз могут вызывать или ухудшать ССЗ, включая аритмии, ишемическую болезнь сердца и сердечную недостаточность, что увеличивает риск заболеваемости и смертности [8, 9, 12]. При ОКС аномальная функция щитовидной железы ассоциируется с более длительным пребыванием в стационаре, развитием сердечной недостаточности и более высокой летальностью [10].

Известно, что субклинические варианты дисфункции щитовидной железы, включающие субклинический гипертиреоз (СГТ) и субклинический тиреотоксикоз (СТТ), более распространены, чем клинически очерченные формы. Сведения о прогностическом значении данной патологии достаточно противоречивы. Есть данные о том, что при СГТ обнаруживается более тяжелое поражение ко-

ронарных артерий и чаще развиваются серьезные неблагоприятные сердечно-сосудистые события при ОКСбпСТ с ЧКВ [11]. Другое исследование указывает на более частое выявление признаков нестабильности бляшек и ремоделирования коронарных артерий с увеличением частоты реваскуляризации при наличии гипертиреоза по сравнению с эутиреозом [13]. Между тем, другие авторы указывают на отсутствие существенного влияния как СГТ, так и СТТ на развитие сердечно-сосудистых событий у пациентов с ОКС [14].

Таким образом, уточнение влияния тиреоидного статуса на исходы стентирования коронарных артерий представляется актуальной клинической проблемой, которая исследована явно недостаточно, в частности, у пациентов с острым коронарным синдромом и при использовании стентов с различным лекарственным покрытием. В настоящее время не ясно, как субклиническая тиреоидная дисфункция влияет на состояние эндотелизации и потерю просвета стентированных сегментов коронарных артерий у пациентов с ОКСбпСТ, в частности, с применением эверолимус-покрытых стентов с оценкой методом прямой коронарной визуализации.

#### Цель исследования

Оценить влияние субклинического гипотиреоза и субклинического тиреотоксикоза на потерю просвета и степень эндотелизации стентов с лекарственным покрытием после стентирования по поводу ОКСбпСТ.

#### Материалы и методы

В исследование включено 173 пациента, экстренно стентированных по поводу ОКСбпСТ, которым в дальнейшем в течение года выполнялось повторное коронарографическое исследование в плановом или экстренном порядке с прицельной оценкой состояния установленных стентов. Больные получали лечение согласно локальному протоколу, в которое в обязательном порядке входила двойная антиагрегантная терапия, высокоинтенсивная терапия статинами, бета-блокаторами и ингибиторами АПФ при отсутствии противопоказаний. В качестве основного показателя оценивалась потеря просвета стентированного сегмента артерии, которая определялась как сужение просвета в зоне ранее установленного стента более 50 % от исходного диаметра не ранее чем через месяц от стентирования.

В отдельную подгруппу проспективного наблюдения включили 40 пациентов с ОКСбпСТ, которым были установлены стенты с лекарственным покрытием, содержащие эверолимус. Повторные

визиты осуществлялись через 6 месяцев и через 1 год. В среднем через  $6,3 \pm 0,3$  месяца после стентирования в этой группе выполнялась оптическая когерентная томография (ОКТ) с прицельной оценкой ранее стентированного сосуда и определением степени эндотелизации, индекса заживления и показателя поздней потери просвета.

Эхокардиография выполнялась на аппарате VIVID 7 (General Electrics, США) по стандартному протоколу исследования.

Коронароангиография выполнялась преимущественно с применением радиального, реже феморального доступа на ангиографических установках Innova 3100 (General Electrics) или Allura Xper FD20 (Phillips), с записью шести стандартных проекций для бассейна левой коронарной артерии и двух проекций для правой коронарной артерии.

ОКТ выполнялась с использованием аппарата ОКТ в частотной области Terumo Lunawave (Terumo Corporation) с применением катетеров FastView. В ходе получения изображения использовался метод замещения крови контрастным веществом Ультравист, тракция осуществлялась в автоматическом режиме со скоростью 20 мм/с с получением поперечных срезов с шагом 0,2 мм. Обработка полученного изображения проводилась с применением встроенного программного обеспечения с визуальным контролем и коррекцией полученных результатов.

Всего проанализировано 35 431 страта стентов в 4068 срезах, полученных при оценке изображений ОКТ. Для каждой страты оценивался факт покрытия неоинтимой, наличие или отсутствие мальпозиции страты. Объемные внутрипросветные дефекты определялись как дополнительные образования в просвете сосуда различной оптической плотности в соответствии с рекомендациями по анализу ОКТ. Индекс заживления (ИЗ) для каждого стента высчитывался по формуле:  $ИЗ = [\% ВД \times 4] + [\% МН \times 3] + [\% Н \times 2] + [\% МП]$ , где % ВД — процент внутрипросветных дефектов наполнения; % МН — процент мальпозированных непокрытых страт; % Н — процент непокрытых страт, прилежащих к сосудистой стенке; % МП — процент мальпозированных покрытых страт [15, 16].

Всем включенным в исследование пациентам оценивался тиреоидный статус. Уровень ТТГ определялся методом ИФА на анализаторе Beckman Coulter (Япония), свободные Т3 и Т4 — на ACCESS IMMUNOASSAY SYSTEMS. За нормальный уровень ТТГ принимались значения от 0,4 до 3,5 мМЕ/л. Уровень ТТГ менее 0,4 мМЕ/л соответствовал низкому значению ТТГ и при нор-

мальном уровне свободного Т4 трактовался как СТТ. Уровень ТТГ более 3,5 мМЕ/л соответствовал СГТ при условии нормального уровня свободного Т4.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием программного обе-

спечения SPSS Statistic 23. Для параметрических показателей применялся однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с проверкой равенства дисперсий с помощью теста Левена. Ненормально распределенные показатели оценивались посредством двустороннего теста Вилкоксона. Для ана-

**Таблица 1. Основные клинико-демографические характеристики пациентов с ОКСбпСТ**

**Table 1. Main clinical and demographic characteristics of patients with NSTEMACS**

Показатель	Группы больных		p
	С потерей просвета (n = 37), n (%)	Без потери просвета (n = 136), n (%)	
Женский пол	16 (43,2 %)	52 (38,2 %)	0,58
Возраст, годы	62,59 ± 11,62	62,7 ± 9,23	0,90
Сахарный диабет	11 (29,7 %)	33 (24,3 %)	0,49
Курение	15 (40,5 %)	50 (36,8 %)	0,61
Инфаркт миокарда как исход ОКС	8 (21,6 %)	20 (14,7 %)	0,31
Фракция выброса левого желудочка (по Simpson), %	56,1 ± 9,1	59,0 ± 9,3	0,10

Примечание: p — достоверность различий.

Note: p — significance of differences.

**Таблица 2. Основные характеристики коронарного русла и стентов, установленных в связи с ОКСбпСТ**

**Table 2. Main characteristics of the coronary bed and stents installed in connection with NSTEMACS**

Показатель	Группы больных		p
	С потерей просвета (n = 37), n (%)	Без потери просвета (n = 136), n (%)	
Степень поражения коронарных артерий			
1. Однососудистое	11 (29,7 %)	15 (11 %)	1,2 = 0,07
2. Двухсосудистое	7 (18,9 %)	27 (19,9 %)	1,3 = 0,005
3. Многососудистое	19 (51,4 %)	94 (69,1 %)	2,3 = 0,61
Значение Syntax Score I	16,8 ± 9,5	20,1 ± 9,2	0,06
Тип установленного стента			
1. Эверолимус с постоянным полимером	18 (48,6 %)	69 (50,7 %)	1,2 = 0,76
2. Эверолимус с биodeградируемым полимером	6 (16,2 %)	27 (19,9 %)	1,3 = 0,61
3. Сиrolимус	12 (32,4 %)	37 (27,2 %)	1,4 = 0,83
4. Зоtаролимус	1 (2,7 %)	3 (2,2 %)	2,3 = 0,49
			2,4 = 0,74
			3,4 = 0,98
Диаметр стента, мм	2,9 ± 0,5	3,0 ± 0,5	0,09
Длина стентированного сегмента, мм	34,6 ± 19,5	36,2 ± 21,3	0,63

Примечание: p — достоверность различий.

Note: p — significance of differences.

лиза дискретных величин использовался критерий  $\chi$ -квадрат, при невозможности его применения — точный критерий Фишера. Для оценки связи между определенным исходом и фактором риска рассчитывалось отношение шансов (ОШ). При оценке исходов использовался анализ логистической регрессии с оценкой полной модели, пошаговым включением и последовательной выборкой.

### Результаты

Из 173 пациентов при повторной коронарографии потеря просвета за счет рестеноза или коронарного тромбоза зафиксирована у 37 человек (21,4 %), у 136 больных (78,6 %) сужения просвета стентированного сегмента не выявлено. Значимых различий в сроках между стентированием и повторной коронарографией в группах не было ( $183 \pm 102$  дня в группе с потерей просвета стента,  $186 \pm 126$  дня в группе без потери просвета,  $p = 0,90$ ). Группы пациентов достоверно не различались по полу, возрасту, основным данным анамнеза (табл. 1).

У пациентов с потерей просвета ранее стентированного сегмента чаще обнаруживалось одностороннее поражение коронарных артерий. Потеря просвета в пределах стента не зависела от его типа (табл. 2).

При оценке тиреоидного статуса у 5 пациентов (2,9 % от числа всех больных) выявлен СТТ, у 34 (19 %) — СГТ. Основные данные по тиреоидному статусу представлены в таблице 3.

При выполнении логистического регрессионного анализа с оценкой полной модели влияния тиреоидного статуса на потерю просвета не обнаружено. Наибольшее влияние на вероятность потери просвета в области стента оказывали степень поражения коронарных артерий, диаметр установ-

ленного стента, а также уровень С-реактивного белка. Прогностический анализ, выполненный методом логистической регрессии с принудительным включением в качестве предикторов потери ряда показателей, выделил параметры Syntax Score I, диаметр стента, количество пораженных коронарных артерий. Представленная модель продемонстрировала высокую статистическую значимость ( $\chi^2 = 69$ ,  $p < 0,001$ ). Качество модели характеризуют: критерий согласия Хосмера-Лемешова ( $\chi^2 = 20,6$ ,  $p = 0,008$ ), коэффициент множественной детерминации ( $R^2$  Найджелкерка = 0,443).

Для полученной модели логистической регрессии пара выражений описывает вероятность прогнозируемой потери просвета. Конечная точка = 1 р:

$$p = 1/(1 + \exp(-z)) \quad (1),$$

$$z = -0,391 \cdot x_1 - 0,06 \cdot x_2 - 0,013 \cdot x_3 + e, \quad (2),$$

где  $z$  — уравнение регрессии (2), основанное на наблюдаемой выборке;

$x_1$  — количество пораженных артерий;

$x_2$  — диаметр стента;

$x_3$  — Syntax Score I;

$e$  — случайная ошибка.

По результатам ОКТ, выполненной у 40 больных через  $6,3 \pm 0,3$  месяца после имплантации эверолимус-покрытых стентов, было установлено, что процент непокрытых страт стента зависел от уровня ТТГ ( $r = 0,42$ ,  $p = 0,007$ ). Чем выше был уровень ТТГ, тем выше был показатель индекса заживления и тем хуже была эндотелизация стента ( $r = 0,37$ ,  $p = 0,016$ ). У пациентов с СГТ, выявленным у 8 человек, толщина неоинтимы и степень потери просвета не зависела от тиреоидного статуса (табл. 4).

При этом показатели индекса заживления и число непокрытых страт стента при наличии

Таблица 3. Тиреоидный статус в зависимости от потери просвета стентированной артерии

Table 3. Thyroid status depending on the loss of lumen of the stented artery

Показатель	Группы больных		P
	С потерей просвета (n = 37), n (%)	Без потери просвета (n = 136), n (%)	
Уровень ТТГ, мМЕ/мл	2,395 (0,114; 6,338)	2,193 (0,114; 7,163)	0,13
СГТ	8 (21,6 %)	26 (19,1 %)	0,73
СТТ	2 (5,4 %)	3 (2,2 %)	0,30

Примечание: ТТГ — тиреотропный гормон, p — достоверность различий.

Note: TSH is thyroid — stimulating hormone, p — significance of differences.

СГТ были достоверно выше, чем у пациентов с эутиреозом (рис. 1, 2).

### Обсуждение

Стентирование коронарных артерий при ОКС позволяет избежать развития инфаркта миокар-

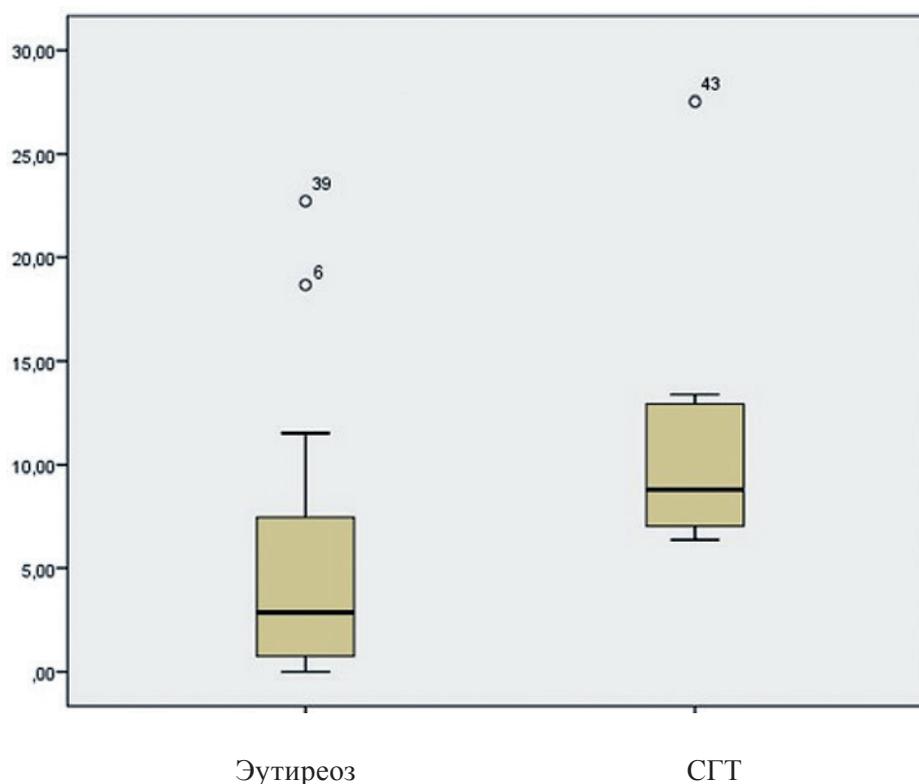
да или уменьшить объем некроза, но и сама имплантация стента может приводить к развитию отдаленных осложнений и повторных инфарктов. Рестеноз внутри стента возникает в 2–10 % случаев ЧКВ, что требует повторной реваскуляризации миокарда. В качестве предикторов потери просве-

**Таблица 4. Состояние коронарных стентов, по данным ОКТ, в зависимости от тиреоидного статуса**

**Table 4. Condition of coronary stents according to OCT data depending on the thyroid process**

Показатель	Группы больных		P
	СГТ (n = 8), n (%)	Эутиреоз (n = 32), n (%)	
Процент непокрытых страт, %	11,4 ± 7,0	4,8 ± 5,5	0,007
Индекс заживления	32,0 ± 13,6	15,6 ± 17,1	0,016
Средняя потеря просвета, %	7,3 ± 4,8	11,7 ± 9,1	0,19
Максимальная потеря просвета, %	18,9 ± 7,3	26,5 ± 14,9	0,17

% Процент непокрытых страт



**Рис. 1. Процент непокрытых страт эверолимус-покрытых стентов, по данным ОКТ, при эутиреозе и СГТ**

**Figure 1. Percentage of uncovered struts of everolimus-eluting stents according to OCT data in euthyroidism and SHT**

та внутри стента выделяют тип стента, наличие сахарного диабета, предыдущую операцию шунтирования и малый калибр сосудов [17].

В анализируемой нами выборке сужение просвета ранее стентированной коронарной артерии отмечалось в каждом третьем случае. Это можно объяснить тем, что в данное исследование большей частью включались пациенты, перенесшие ОКСбпСТ, у которых на момент повторной госпитализации имелись показания для повторной коронарографии. При этом стоит отметить, что повторно в стационар обращались 15 % больных от числа всех лиц, которые были госпитализированы с ОКС. Согласно современным рекомендациям по реваскуляризации миокарда всем пациентам показано имплантировать стенты с лекарственным покрытием [18]. В своей работе мы использовали только покрытые стенты, включая стенты последних поколений. Мы не обнаружили зависимости потери просвета стентированных сосудов от вида антипролиферативного покрытия и типа платформ стентов, а также большинства клини-

ко-анамнестических характеристик пациентов. В числе наиболее значимых предикторов потери просвета выступил малый диаметр стента. Обнаружилось отрицательное значение параметров Syntax Score I и количества пораженных коронарных артерий в отношении потери просвета. Следует подчеркнуть, что в качестве конечных точек мы оценивали параметры ремоделирования стентированных сосудов, а не клинические исходы. По-видимому, предикторы потери просвета могут отличаться от установленных для неблагоприятных клинических исходов.

Примечательно, что параметры тиреоидного статуса в решающее правило не вошли. Это вполне соответствует результатам крупного проспективного многоцентрового обсервационного исследования с включением 1802 пациентов с ОИМпСТ и ОИМбпСТ (17,3 % из них имели СГТ и 1,2 % — СТТ), согласно которому влияния на клинические исходы тиреоидная дисфункция не оказала [14]. Аналогичные результаты получены и в проспективном когортном исследовании с участием

% Индекс заживления

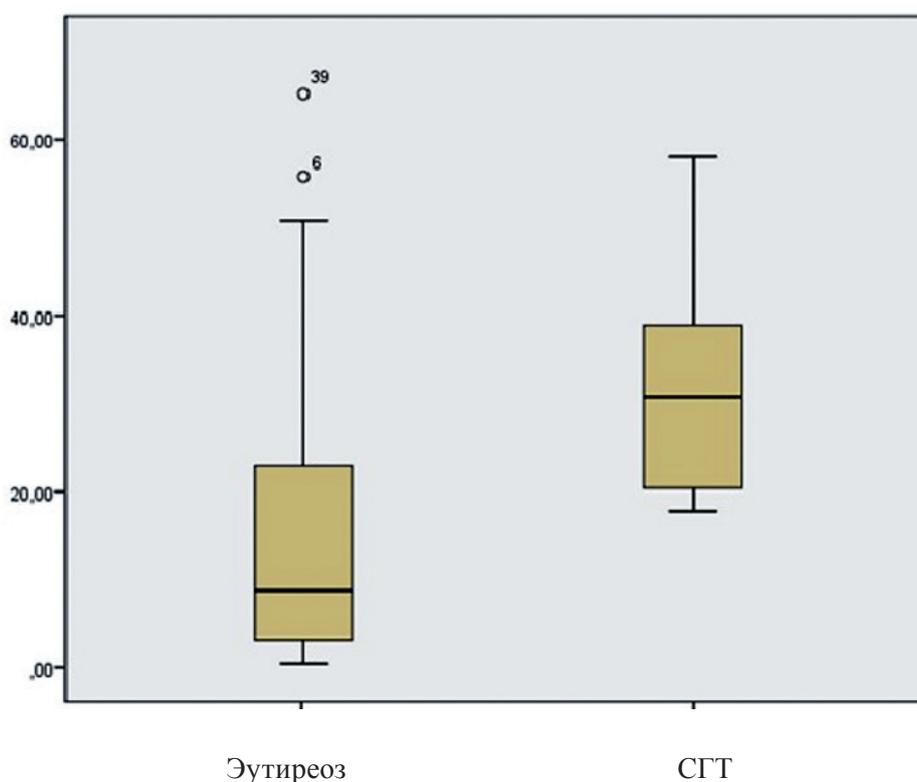


Рис. 2. Индекс заживления эверолимус-покрытых стентов, по данным ОКТ, при эутиреозе и СТТ

Figure 2. Healing index of everolimus-eluting stents according to OCT data in euthyroidism and STT

1560 пациентов с острым коронарным синдромом, которым было выполнено ЧКВ. Частота развития неблагоприятных исходов, включающих смерть от всех причин, сердечно-сосудистую смерть, нефатальный инфаркт миокарда и потребность во внеплановой реваскуляризации, от наличия СГТ или СТТ не зависела [19]. Примечательно, что в обоих исследованиях в качестве сильного предиктора неблагоприятных клинических событий выступил синдром низкого ТЗ. Как известно, при ОКС низкие уровни ТЗ при нормальных значениях ТТГ трактуются как проявление синдрома эутиреоидной патологии, обусловленной проявлением острого ССЗ, не связанного с щитовидной железой. Именно этот показатель может быть использован для прогнозирования исходов ОКС [19, 20]. Традиционно основанием для определения уровня тиреоидных гормонов является отклонение в содержании ТТГ. В нашей работе значение этого феномена не исследовалось. Учитывая, что частота синдрома низкого ТЗ среди больных с ОКС, как показано в данных работах, невелика (1,2–3,9 %), целесообразность его выявления вызывает сомнение.

У 40 больных через 6 месяцев после имплантации проведена прямая визуализация зоны эверолиму-содержащих стентов. Именно в эти сроки обычно обсуждается вопрос о деэскалации анти-тромботической терапии. ОКТ не выявила существенной потери просвета, однако у пациентов с СГТ обнаружены признаки недостаточной эндотелизации страт стента, что можно связать с вероятным торможением репаративных процессов. Данная находка относится к исследованным нами эверолиму-покрытым стентам, но, по-видимому, должна стать основанием для оценки влияния СГТ на эндотелизацию и других видов стентов с лекарственным покрытием.

### Заключение

Таким образом, рутинное определение показателей тиреоидного статуса у больных с ОКСбпСТ для выявления субклинической тиреоидной дисфункции не позволяет получить значимой прогностической информации относительно риска потери просвета имплантированных стентов.

Между тем, у пациентов с СГТ выявлена недостаточная эндотелизация эверолиму-покрытых стентов через 6 месяцев после стентирования по поводу ОКСбпСТ. Учитывая потенциальный риск тромботических осложнений, по-видимому, целесообразно выявление СГТ у таких пациентов при решении вопроса о деэскалации анти-тромботической терапии.

При этом остается открытым вопрос о целесообразности коррекции параметров субклинической дисфункции с целью модификации прогноза.

### Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциально конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

### Финансирование/Funding

Работа выполнена в рамках Государственного задания: «Механизмы повышения устойчивости к ишемическому/реперфузионному повреждению головного мозга и сердца в эксперименте *in vivo* и разработка наиболее эффективных методов снижения ишемической нагрузки на миокард» (121032200171-6)./ The work was carried out within the framework of the State assignment: “Mechanisms for increasing resistance to ischemic/reperfusion injury of the brain and heart in an *in vivo* experiment and the development of the most effective methods for reducing ischemic load on the myocardium” (121032200171-6).

### Список литературы / References

1. Tsai I-T, Wang C-P, Lu Y-C, et al. The burden of major adverse cardiac events in patients with coronary artery disease. *BMC Cardiovasc Disord.* 2017;17(1):1. DOI: 10.1186/s12872-016-0436-7.
2. Abramova OV, Sayganov SA. Comparison of outcomes of revascularization in acute coronary syndrome after primary coronary angioplasty// *Bulletin of the North-Western State Medical University named after A. I. Mechnikov.* 2020. Vol. 12. No. 1. P. 21–30. In Russian [Абрамова О.В., Сайганов С.А. Сравнение исходов реваскуляризации при остром коронарном синдроме после первичной коронарной ангиопластики //Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И. И. Мечникова. 2020. Т. 12. №. 1. С. 21–30].
3. Puymirat E, Simon T, Cayla G, et al. Acute Myocardial Infarction: Changes in Patient Characteristics, Management, and 6-Month Outcomes Over a Period of 20 Years in the FAST-MI Program (French Registry of Acute ST-Elevation or Non-ST-Elevation Myocardial Infarction) 1995 to 2015. *Circulation.* 2017;136(20):1908–1919. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.030798.
4. Räber L, Jüni P, Nüesch E, et al. Long-term comparison of everolimus-eluting and sirolimus-eluting stents for coronary revascularization. *J Am Coll Cardiol.* 2011;57(21):2143–2151. DOI: 10.1016/j.jacc.2011.01.023.
5. Buccheri D, Piraino D, Andolina G, Cortese B. Understanding and managing in-stent restenosis: a review of clinical data, from pathogenesis to treatment. *J Thorac Dis.* 2016;8(10):E1150–E1162. DOI: 10.21037/jtd.2016.10.93.

6. Shumakov DV, Shekhyan GG, Zybin DI, et al. Late complications of percutaneous coronary interventions // *Breast Cancer*. 2020. Vol. 28. No. 10. P. 25–28. In Russian [Шумаков Д.В., Шехян Г.Г., Зыбин Д.И. и др. Поздние осложнения чрескожных коронарных вмешательств // *РМЖ*. 2020. Т. 28. № 10. С. 25–28].
7. Volkova AR, Dora SV, Berkovich OA, et al. // *Therapy*. Subclinical hypothyroidism — a new cardiovascular risk factor. 2016. Vol. 6. No. 10. P. 23–28. In Russian [Волкова А.Р., Дора С.В., Беркович О.А. и др. // *Терапия*. Субклинический гипотиреоз — новый фактор сердечно-сосудистого риска. 2016. Т. 6. № 10. С. 23–28].
8. Cappola AR, Desai AS, Medici M, et al. Thyroid and Cardiovascular Disease: Research Agenda for Enhancing Knowledge, Prevention, and Treatment. *Circulation*. 2019;139(25):2892–2909. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.036859.
9. Li W, He Q, Zhang H, et al. Thyroid-stimulating hormone within the normal reference range has a U-shaped association with the severity of coronary artery disease in nondiabetic patients but is diluted in diabetic patients. *J Investig Med*. 2023;71(4):350–360. DOI: 10.1177/10815589221149187.
10. Paudel N, Alurkar VM, Kaffle R, et al. Thyroid profile as a marker of poor prognostic factor in patients with acute coronary syndrome: a tertiary care hospital based observational study. *Nepal Hear J*. 2018 May 8;15(1):39–41. DOI: 10.3126/njh.v15i1.19715.
11. Halilčević M, Begić E, Džubur A, et al. Relation between thyroid hormonal status, neutrophillymphocyte ratio and left ventricular systolic function in patients with acute coronary syndrome. *Med Glas (Zenica)*. 2023 Feb 1;20(1). DOI: 10.17392/1543-22.
12. Collet TH, Gussekloo J, Bauer DC, et al. Subclinical hyperthyroidism and the risk of coronary heart disease and mortality. *Arch Intern Med*. 2012;172(10):799–809. DOI: 10.1001/archinternmed.2012.402.
13. Beyer C, Plank F, Friedrich G, et al. Effects of Hyperthyroidism on Coronary Artery Disease: A Computed Tomography Angiography Study. *Can J Cardiol*. 2017;33(10):1327–1334. DOI: 10.1016/j.cjca.2017.07.002.
14. Jabbar A, Ingoe L, Thomas H, et al. Prevalence, predictors and outcomes of thyroid dysfunction in patients with acute myocardial infarction: the ThyrAMI-1 study. *J Endocrinol Invest*. 2021;44(6):1209–1218. DOI: 10.1007/s40618-020-01408-0.
15. Smirnov KA, Biryukov AV, Ivanchenko RD. History of development and comparative assessment of modern stents for coronary arteries. *Circulatory pathology and cardiac surgery*. 2019. Т. 23. No. 1S. P. 9–17. In Russian [История развития и сравнительная оценка современных стентов для коронарных артерий / К. А. Смирнов, А. В. Бирюков, Р. Д. Иванченко и др. // *Патология кровообращения и кардиохирургия*. 2019. Т. 23, № 1S. С. 9–17].
16. Souteyrand G, Amabile N, Mangin L, et al. Mechanisms of stent thrombosis analysed by optical coherence tomography: insights from the national PESTO French registry. *Eur Heart J*. 2016;37(15):1208–1216. DOI: 10.1093/eurheartj/ehv711.
17. Ullrich H, Olschewski M, Münzel T, Gori T. Coronary In-Stent Restenosis: Predictors and Treatment. *Dtsch Arztebl Int*. 2021;118(38):637–644. DOI: 10.3238/arztebl.m2021.0254.
18. Izkhakov E, Zahler D, Rozenfeld KL, et al. Unknown Subclinical Hypothyroidism and In-Hospital Outcomes and Short- and Long-Term All-Cause Mortality among ST Segment Elevation Myocardial Infarction Patients Undergoing Percutaneous Coronary Intervention. *J Clin Med*. 2020;9(12):3829. DOI: 10.3390/jcm9123829.
19. Cao Q, Jiao Y, Yu T, Sun Z. Association between mild thyroid dysfunction and clinical outcome in acute coronary syndrome undergoing percutaneous coronary intervention. *Cardiol J*. 2020;27(3):262–271. DOI: 10.5603/CJ.a2018.0097.
20. Arambam P, Kaul U, Ranjan P, Janardhanan R. Prognostic implications of thyroid hormone alterations in acute coronary syndrome — A systematic review. *Indian Heart J*. 2021 Mar-Apr;73(2):143–148. DOI: 10.1016/j.ihj.2020.11.147. Epub 2020 Nov 23. PMID: 33865509; PMCID: PMC8065368.

#### Информация об авторах:

Нифонтов Евгений Михайлович, д.м.н., профессор кафедры факультетской терапии, заведующий лабораторией неотложной кардиологии института сердечно-сосудистых заболеваний, ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. ак. И. П. Павлова Минздрава России;

Трусов Иван Сергеевич, к.м.н., доцент кафедры терапии факультетской с курсом эндокринологии и кардиологии с клиникой, ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. ак. И. П. Павлова Минздрава России;

Хачикян Татевик Тиграновна, клинический ординатор второго года кафедры терапии факультетской с курсом эндокринологии и кардиологии с клиникой, ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. ак. И. П. Павлова Минздрава России;

Бирюков Алексей Владимирович, к.м.н., заведующий отделением рентгенохирургических методов диагностики и лечения № 1, ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. ак. И. П. Павлова Минздрава России;

Красичков Александр Сергеевич, д.т.н., старший научный сотрудник лаборатории неотложной кардиологии НИИ ССЗ, ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. ак. И. П. Павлова Минздрава России; доцент кафедры радиотехнических систем, СПбГЭТУ «ЛЭТИ» им. В. И. Ульянова (Ленина);

Шаповалова Диана Сергеевна, студент 6 курса лечебного факультета, ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. ак. И. П. Павлова Минздрава России;

Сердюкова Ирина Анатольевна, аспирант кафедры радиотехнических систем, СПбГУ «ЛЭТИ» им. В. И. Ульянова (Ленина).

**Authors information:**

Evgeniy M. Nifontov, MD, Professor of the Faculty Therapy Department, Head of the Laboratory of Emergency Cardiology, Institute of Cardiovascular Diseases, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University.

Ivan S. Trusov, PhD, docent, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University;

Tatevik T. Khachikyan, 2<sup>nd</sup> year cardiologist resident, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University;

Alexey V. Biryukov, PhD, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University;

Alexandr S. Krasichkov, Doctor of Technical Sciences, Senior researcher at the Laboratory of Emergency Cardiology, Research Institute of Cardiovascular Diseases, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education docent, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University; Associate Professor, Department of Radio Engineering Systems, Saint Petersburg Electrotechnical University “LETI”;

Diana S. Shapovalova, 6th year student, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University;

Irina A. Serdiukova, PhD student, Saint Petersburg Electrotechnical University “LETI”.

# $\beta$ -(2R,3S,5R)-2-(ГИДРОКСИМЕТИЛ)-6-(5-ФЕНИЛ-2H-ТЕТРАЗОЛ-2-ИЛ) ТЕТРАГИДРО-2H-ПИРАН-3,4,5-ТРИОЛ. СИНТЕЗ И КОМПЬЮТЕРНЫЙ ПРОГНОЗ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

Павлюкова Ю. Н.<sup>1</sup>, Певзнер Л. М.<sup>1</sup>, Гукова П. А.<sup>1</sup>,  
Новожилова Д. Д.<sup>1</sup>, Данагулян Г. Г.<sup>2</sup>, Островский В. А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет)», Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Российско-Армянский (Славянский) университет, Ереван, Армения

**Контактная информация:**  
Островский Владимир Аронович,  
ФГБОУ ВО «СПбГТИ (ТУ)»,  
Московский пр., д. 24–26/49, лит. А,  
Санкт-Петербург, Россия, 190013.  
E-mail: va\_ostrovskii@mail.ru

Статья поступила в редакцию 01.08.2023  
и принята к печати 20.11.2023.

## Резюме

**Актуальность.** Актуальной проблемой создания отечественного производства современных лекарственных средств в условиях санкционного давления является молекулярный дизайн и разработка рациональных методов синтеза активных фармацевтических ингредиентов оригинальных препаратов и молодых генериков. **Цель.** В настоящей работе выполнен компьютерный прогноз биологической активности  $\beta$ -(2R,3S,5R)-2-(гидроксиметил)-6-(5-фенил-2H-тетразол-2-ил) тетрагидро-2H-пиран-3,4,5-триола **1** — соединения, в молекуле которого присутствуют два перспективных фармакофорных фрагмента: тетразол и галактопиранозил. Оба фрагмента изучаемой молекулы активно используются ведущими научными центрами для молекулярного конструирования и синтеза перспективных активных фармацевтических ингредиентов (АФИ) современных лекарственных средств. **Материалы и методы.** С этой целью использовали последние версии программы PASS в сочетании с молекулярным докингом и скорингом в программе AutoDock Vina. **Результаты.** На основании данных компьютерного прогноза показано, что описываемое соединение может обладать мультитаргетной биологической активностью. **Заключение.** Предложен рациональный, пригодный для масштабирования метод синтеза соединения **1**, которое рекомендовано для тестирования *in vitro*, *in vivo* активности.

**Ключевые слова:** гибридная молекула, прогноз биоактивности, синтез, тетразолгалактопиранозил.

Для цитирования: Павлюкова Ю.Н., Певзнер Л.М., Гукова П.А. и др.  $\beta$ -(2R,3S,5R)-2-(гидроксиметил)-6-(5-фенил-2H-тетразол-2-ил) тетрагидро-2H-пиран-3,4,5-триол. Синтез и компьютерный прогноз биологической активности. Трансляционная медицина. 2023;10(6):495-506. DOI: 10.18705/2311-4495-2023-10-6-495-506. EDN: HNQXFD

# $\beta$ -(2R,3S,5R)-2-(HYDROXYMETHYL)-6-(5-PHENYL-2H-TETRAZOLE-2-YL) TETRAHYDRO-2H-PIRAN-3,4,5-TRIOLE. SYNTHESIS AND COMPUTER PREDICTION OF BIOLOGICAL ACTIVITY

Yulia N. Pavlyukova<sup>1</sup>, Leonid M. Pevsner<sup>1</sup>, Polina A. Gukova<sup>1</sup>,  
Darya D. Novozhilova<sup>1</sup>, Gevorg G. Danagulyan<sup>2</sup>,  
Vladimir A. Ostrovskii<sup>1</sup>

<sup>1</sup> State Institute of technology, Saint Petersburg, Russia

<sup>2</sup> Russian-Armenian (Slavonic) University, Yerevan, Armenia

Corresponding author:  
Vladimir A. Ostrovskii,  
State Institute of technology,  
Moskovsky prosp., 24–26/49, Letter A,  
Saint Petersburg, Russia, 190013.  
E-mail: va\_ostrovskii@mail.ru

Received 01 August 2023; accepted  
20 November 2023.

## Abstract

**Background.** An urgent problem of creating a domestic production of modern medicines under the conditions of sanctions pressure is the molecular design and development of rational methods for the synthesis of active pharmaceutical ingredients of original drugs and young generics. **Objective.** In this work, a computer prediction of the biological activity of  $\beta$ -(2R,3S,5R)-2-(hydroxymethyl)-6-(5-phenyl-2H-tetrazole-2-yl) tetrahydro-2H-piran-3,4,5-triol **1** — compounds, in the molecule of which there are two promising pharmacophore fragments, was performed: tetrazolyl and galactopyranosyl. Both fragments of the studied molecule are actively used by leading scientific centers for the molecular design and synthesis of promising active pharmaceutical ingredients (API) of modern medicines. **Design and methods.** For this purpose, the latest versions of the PASS computer complex were used in combination with molecular docking and scoring in the AutoDoc Vina program. **Results.** Based on computer prediction data, it is shown that this compound may have multi-target biological activity. **Conclusion.** A rational, scalable method for the synthesis of compound **1**, which is recommended for testing in vitro, in vivo activity, is proposed.

**Key words:** bioactivity prediction, hybrid molecule, synthesis, tetrazolyl galactopyranosyl.

*For citation: Pavlyukova YuN, Pevsner LM, Gukova PA, et al.  $\beta$ -(2R,3S,5R)-2-(hydroxymethyl)-6-(5-phenyl-2H-tetrazole-2-yl) tetrahydro-2H-piran-3,4,5-triol. Synthesis and computer prediction of biological activity Translyatsionnaya meditsina=Translational Medicine. 2023;10(6):495-506 (In Russ.) DOI: 10.18705/2311-4495-2023-10-6-495-506. EDN: HNXFD*

**Список сокращений:** АФИ — активные фармацевтические ингредиенты, PASS — Prediction of Activity Spectra for Substances, ТЕВАВ — триэтилбензиламмоний бромистый.

## Введение

Актуальность проблемы импортозамещения лекарственных средств в условиях санкционного давления на российскую экономику вполне очевидна. Проблема находится в фокусе внимания Правительства РФ [1]. Путь разработки и выпуска на фармацевтический рынок оригинального

лекарственного средства долог и тернист. Этапы производства активных фармацевтических ингредиентов (АФИ) оригинального лекарственного средства (без учета доклинических и клинических исследований) могут быть представлены в виде пазлов, которые в итоге необходимо сложить в общую картину (рис. 1).

Важнейшим этапом создания АФИ оригинальных лекарственных средств и молодых генериков является разработка рациональных методов тонкого органического синтеза. Более 70 % АФИ лекарственных средств имеют в составе молеку-

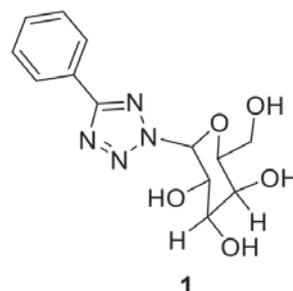
лы фрагментов азот- и кислородсодержащих гетероциклических соединений [2]. Производные тетразола и галактопиранозы входят в число наиболее привлекательных фармакофорных фрагментов для конструирования молекул лекарственных кандидатов и АФИ современных лекарственных средств [3–5].

Тетразольный цикл является биоизостерным аналогом карбоксильной и цис-амидной групп [6]. Вместе с тем, тетразольный цикл в живых системах образует водородные связи, в том числе многоцентровые, что оказывает положительное влияние на образование и устойчивость комплексов «лиганд-рецептор» [3]. Эти и некоторые другие свойства тетразольного цикла делают его перспективным скаффолдом при разработке активных ингредиентов мультитаргетных лекарственных средств [7].

Согласно данным работы [8], полезным фрагментом для конструирования молекул биологически активных соединений является также 2,3,4,6-тетра-О-ацетил-D-галактопиранозил. Этот фрагмент весьма перспективен для повышения биодоступности. После снятия ацетильной защиты соединения с галактопиранозильным остатком приобретают растворимость в физиологических средах, а токсичность их по сравнению с агликоном снижается. Подобным строением обладают,

например, индукторы экспрессии генов в растительных клетках [9].

Недавно Kun и соавторы (2018 г.) и Kyriakis и коллеги (2019 г.) [10, 11] опубликовали метод синтеза и некоторые свойства  $\beta$ -(2R,3S,5R)-2-(гидроксиметил)-6-(5-фенил-2H-тетразол-2-ил) тетрагидро-2H-пиран-3,4,5-триола **1**. В молекуле этого «гибридного» гетероциклического соединения присутствует как тетразольное кольцо, так и галактопиранозильный цикл.



### Компьютерный прогноз биологической активности соединения **1**

Для того чтобы оценить необходимость синтеза и экспериментального тестирования биологической (*in vitro*, *in vivo*) активности, в последнее время используют методы молекулярного моделирования [12, 13]. В настоящей работе мы при-



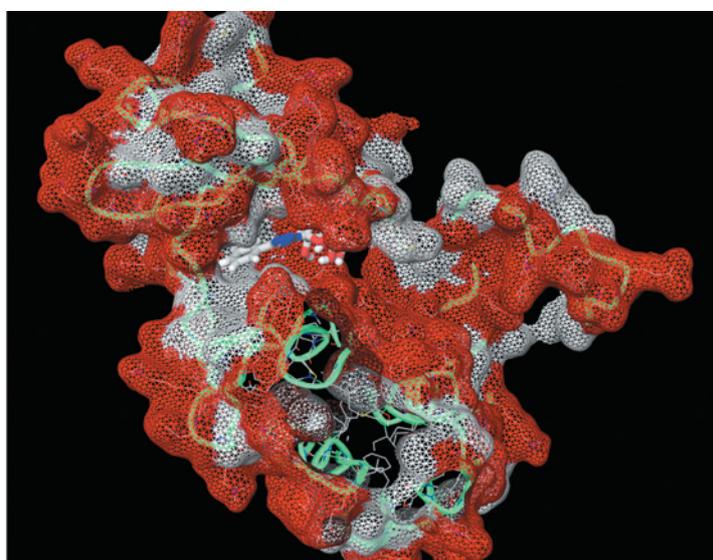
Рис. 1. Этапы разработки АФИ оригинального лекарственного средства

Figure 1. Stages of the development of an API (Active Pharmaceutical Ingredients) original medicines

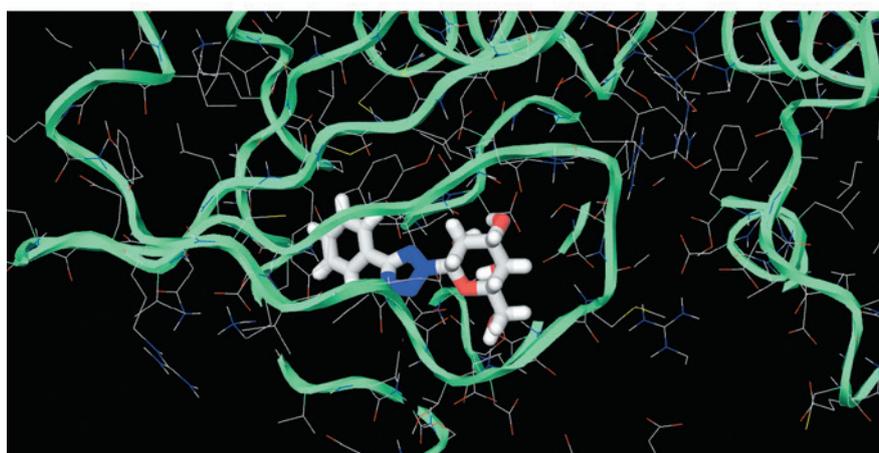
Таблица 1. Результаты прогнозирования активности 1-(5-фенил-2*H*-тетразол-2-ил)- $\beta$ -D-галактопиранозы 1 в PASSOnline (classic) и в PASSOnline (2022)

Table 1. Prediction Results for the Activity of 1-(5-Phenyl-2*H*-tetrazol-2-yl)- $\beta$ -D-galactopyranose 1 in PASSOnline (classic) and PASSOnline (2022)

Pa	Pi	Activity (Активность)
PASSOnline (classic)		
0.920	0.007	Ингибитор CDP-глицерол глицерофосфотрансферазы (CDP-glycerol glycerophosphotransferase inhibitor)
PASSOnline (2022)		
0,852	0,005	Антидиабетическая (Antidiabetic)
0,852	0,005	Ингибитор циклофилина D (Cyclophilin D inhibitor)



а



б

Рис. 2. Позиционирование лиганда — молекулы  $\beta$ -(2*R*,3*S*,5*R*)-2-(гидроксиметил)-6-(5-фенил-2*H*-тетразол-2-ил) тетрагидро-2*H*-пиран-3,4,5-триола 1 в активном сайте 3'-фосфотрансферазы (докинг): а — объемная, б — ленточная модель макромолекулы биологической мишени

Figure 2. Ligand positioning — molecule of  $\beta$ -(2*R*,3*S*,5*R*)-2-(hydroxymethyl)-6-(5-phenyl-2*H*-tetrazol-2-yl) tetrahydro-2*H*-pyran-3,4,5-triol 1 in the active site of 3'-phosphotransferase (docking): a — volumetric model, b — ribbon model of the biological target macromolecule

менили online доступные варианты *in silico* для прогноза биологической активности соединения **1**. С этой целью использовали программу PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances), с помощью которой попытались выявить наиболее вероятные биологические мишени для соединения **1** [14], а также провели молекулярный докинг и скрининг — процедуры, позволяющие оценить степень комплементарности молекулярной структуры данного соединения в соответствующей активной полости молекулярной мишени, отвечающей за те или иные функции в живых системах [15].

Скрининг проводили как с применением PASSOnline (classic), так и с помощью актуальной версии PASSOnline (2022). В результате были выявлены вероятные активности соединения **1** по отношению к различным биологическим мишеням (табл. 1).

Скрининг с применением программы PASSOnline (classic) показал наибольшее значение вероятностного фактора  $P_a$  для оценки проявления ингибирующей активности соединения **1** по отношению к CDP-глицерол глицерофосфотрансферазе (табл. 1). Ингибирование данного

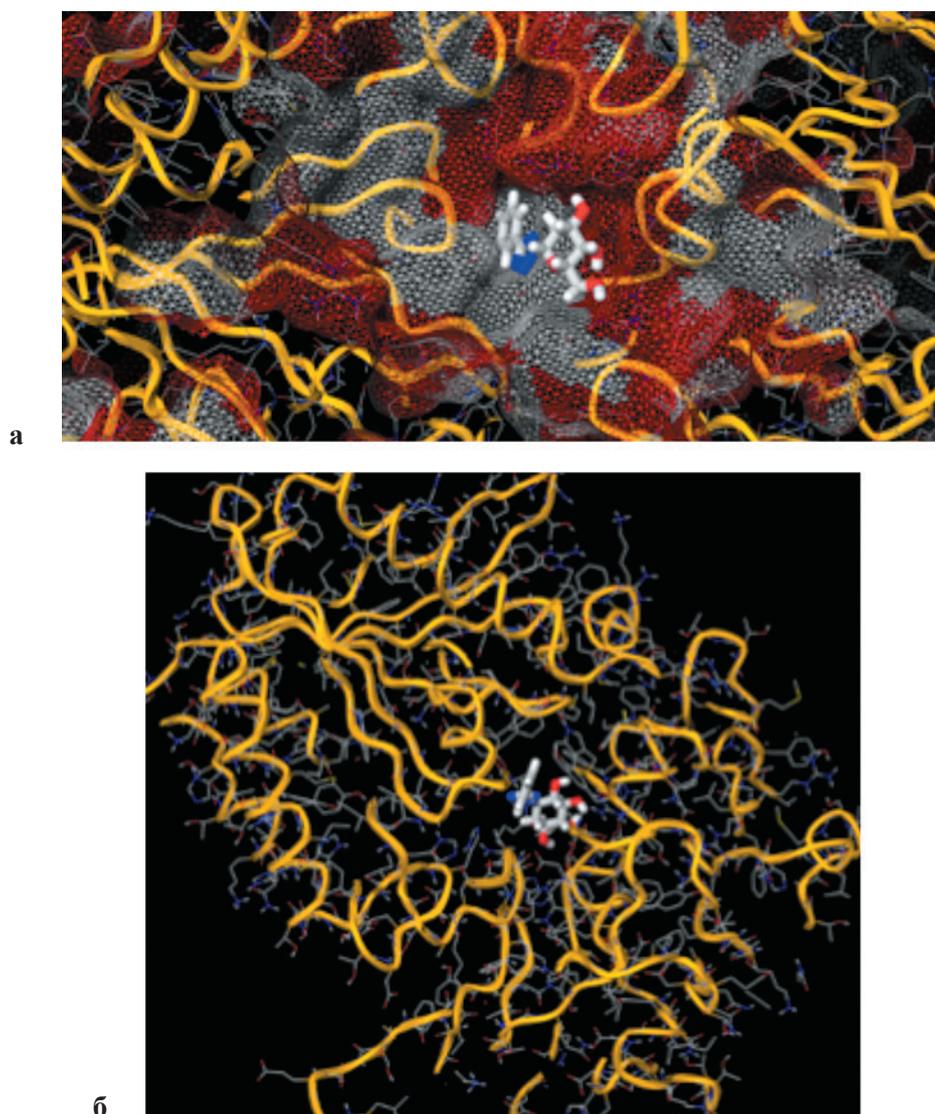


Рис. 3. Позиционирование лиганда — молекулы  $\beta$ -(2R,3S,5R)-2-(гидроксиметил)-6-(5-фенил-2H-тетразол-2-ил) тетрагидро-2H-пиран-3,4,5-триола **1** в активном сайте дипептидилпептидазы-4: а — объемная, б — ленточная модель макромолекулы биологической мишени

Figure 3. Ligand positioning — molecule of  $\beta$ -(2R,3S,5R)-2-(hydroxymethyl)-6-(5-phenyl-2H-tetrazol-2-yl) tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triol **1** in the active site of dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4): a — volumetric model, b — ribbon model of the biological target macromolecule

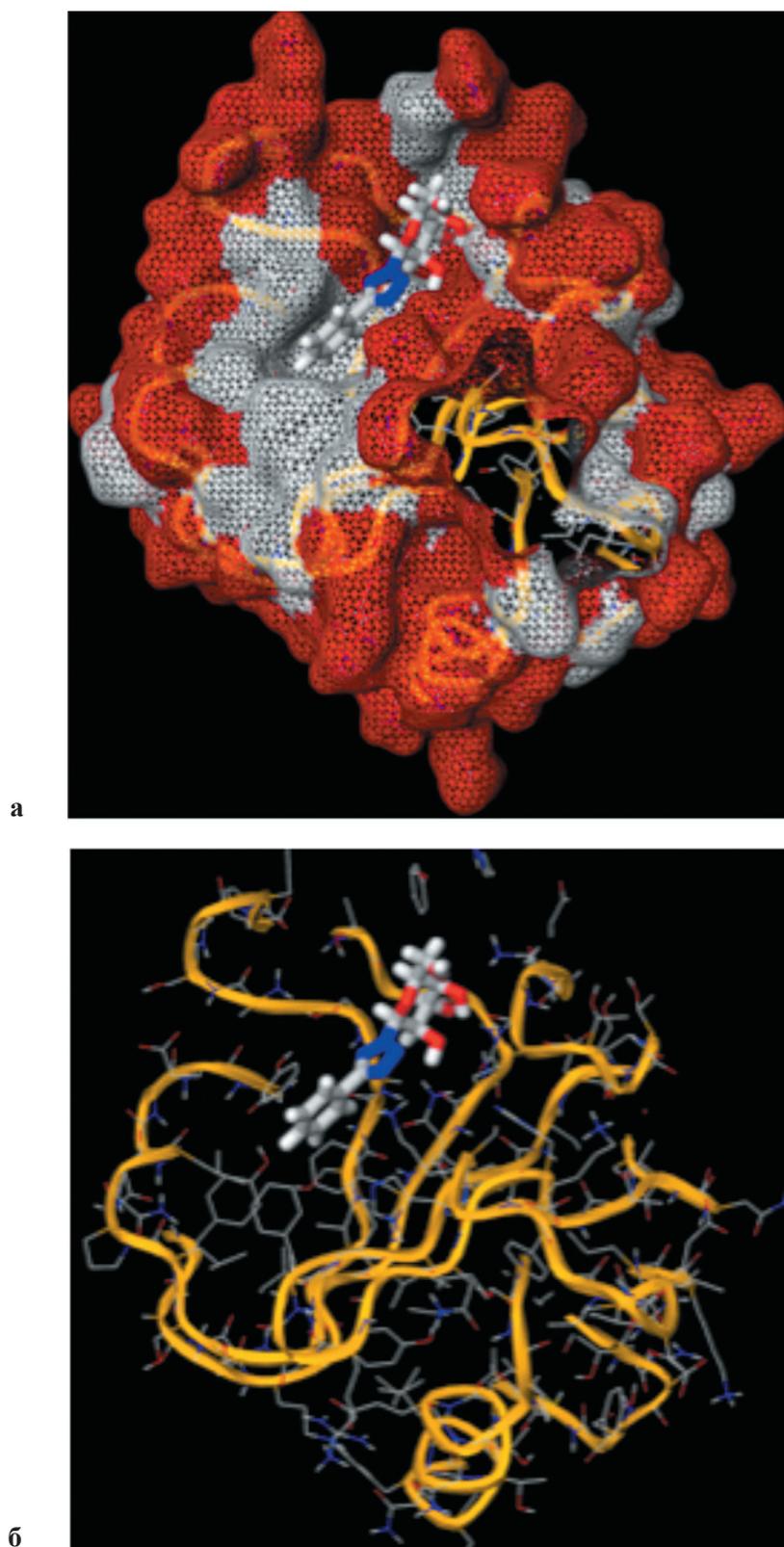


Рис. 4. Позиционирование лиганда — молекулы  $\beta$ -(2R,3S,5R)-2-(гидроксиметил)-6-(5-фенил-2*H*-тетразол-2-ил) тетрагидро-2*H*-пиран-3,4,5-триола 1 в активном сайте фермента циклофилина D (CypD): а — объемная, б — ленточная модель макромолекулы биологической мишени

Figure 4. Ligand positioning — molecule of  $\beta$ -(2R,3S,5R)-2-(hydroxymethyl)-6-(5-phenyl-2*H*-tetrazol-2-yl) tetrahydro-2*H*-pyran-3,4,5-triol 1 in the active site of the enzyme cyclophilin D (CypD): a — volumetric model, b — ribbon model of the biological target macromolecule

фермента является важным фактором регулирования обмена веществ в организме [16]. Мы рассмотрели варианты позиционирования молекулы соединения **1** в активном сайте 3'-фосфотрансферазы (3'-phosphotransferase) — фермента, также относящегося к семейству трансфераз. Данную модель мы нашли в ресурсе доступного пакета программ AutoDock Vina (докинг).

Скоринг показал высокую энергию связывания между  $\beta$ -(2R,3S,5R)-2-(гидроксиметил)-6-(5-фенил-2*H*-тетразол-2-ил) тетрагидро-2*H*-пиран-3,4,5-триолом **1** и 3'-фосфотрансферазой: -8,8 Ккал/моль.

PASSOnline (2022) показал также, что для соединения **1** наблюдаются одинаковые и достаточно высокие значения вероятностного фактора антидиабетической активности и ингибитора циклофилина D (табл. 1). Эти данные косвенно указывают на возможность применения соединения **1** в терапии сахарного диабета 2 типа, а также как средства лечения патологий ЦНС. Из доступного нам ресурса AutoDock Vina мы выбрали дипептидилпептидазу-4 (Dipeptidylpeptidase IV), которая играет важную роль в метаболизме глюкозы. Ингибиторы данного фермента используют в фармакотерапии сахарного диабета 2 типа [17]. Ниже приведены варианты позиционирования молекулы соединения **1** в активном сайте дипептидилпептидазы-4 (рис. 3).

Скоринг показал высокую энергию связывания между  $\beta$ -(2R,3S,5R)-2-(гидроксиметил)-6-(5-фенил-2*H*-тетразол-2-ил) тетрагидро-2*H*-пиран-3,4,5-триолом **1** и активным сайтом дипептидилпептидазы-4: -8,0 Ккал/моль.

Cyclophilin D (CypD) (табл. 1) играет центральную роль в контроле митохондриальной биоэнергетики, регулируя уровень кальция. Ферментативную активность каталитического участка циклофилинов млекопитающих в ряде случаев необходимо блокировать для предотвращения отторжения при аллотрансплантации [19].

Ниже приведены варианты позиционирования молекулы соединения **1** в активном сайте фермента циклофилина D (CypD) (рис. 4).

Скоринг показал достаточно высокую энергию связывания между  $\beta$ -(2R,3S,5R)-2-(гидроксиметил)-6-(5-фенил-2*H*-тетразол-2-ил) тетрагидро-2*H*-пиран-3,4,5-триолом **1** и ферментом циклофилин D (CypD): -7,7 Ккал/моль.

Таким образом, компьютерный прогноз биологической активности  $\beta$ -(2R,3S,5R)-2-(гидроксиметил)-6-(5-фенил-2*H*-тетразол-2-ил) тетрагидро-2*H*-пиран-3,4,5-триола **1** показал значительную вероятность проявления этим соединением мультитаргетной биологической активности.

На следующем этапе настоящей работы мы выполнили синтез соединения **1** с целью обеспечения последующего тестирования *in vitro*, *in vivo*.

### Синтез $\beta$ -(2R,3S,5R)-2-(гидроксиметил)-6-(5-фенил-2*H*-тетразол-2-ил) тетрагидро-2*H*-пиран-3,4,5-триола **1**

Схема синтеза соединения **1**, по данным работы [10], включает несколько химических стадий. На первой стадии проводят алкилирование 5-фенилтетразола **2** 1- $\alpha$ -бром-2,3,4,6-тетра-О-ацетил-D-галактопиранозой **3** в безводном ацетоне. При этом в качестве катализатора используют  $K_2CO_3$ . В результате образуются два региоизомерных продукта **4** и **5** (схема 1, условия i). Образование двух региоизомеров является следствием механизма электрофильных реакций с участием эндоциклических атомов азота тетразольного кольца, подробно рассмотренного в обзорной статье [19].

Подчеркнем, что для синтеза соединения **1** может быть использован только индивидуальный региоизомер **5**. В работе [10] описано разделение региоизомеров **4** и **5** с помощью колоночной хроматографии. При этом соединение **5** было выделено из смеси региоизомеров в индивидуальном виде. На второй стадии проводят удаление защитных ацетильных групп в стандартных условиях [10, 20] с получением целевого соединения **1**. Очевидно, что наиболее проблемной в схеме синтеза соединения **1** следует считать стадию алкилирования 5-фенилтетразола **2** 1- $\alpha$ -бром-2,3,4,6-тетра-О-ацетил-D-галактопиранозой **3**. Приведенные в статье [10] условия проведения реакции нас не вполне устроили. Во-первых, процесс проводят в среде легковоспламеняющегося растворителя — ацетона, который предварительно тщательно обезвоживают, а во-вторых, катализатор — безводный  $K_2CO_3$  не растворим в ацетоне. Это затрудняет течение реакции, протекающей на границе системы «твердая фаза — жидкость». В-третьих, наблюдается образование двух региоизомеров **4** и **5** (схема 1, условия i). Разделение региоизомеров и выделение ключевого полупродукта **5** выполняли с помощью колоночной хроматографии; элюент гексан-ацетон = 3:1.

В качестве альтернативы мы рассмотрели возможность применения для алкилирования тетразола **2** бромидом **3** методологию межфазного катализа (МФК) [21].

В этом случае алкилирование тетразола **2** бромпроизводным тетраацетилгалактопиранозы **3** проводили в двухфазной системе «хлороформ —

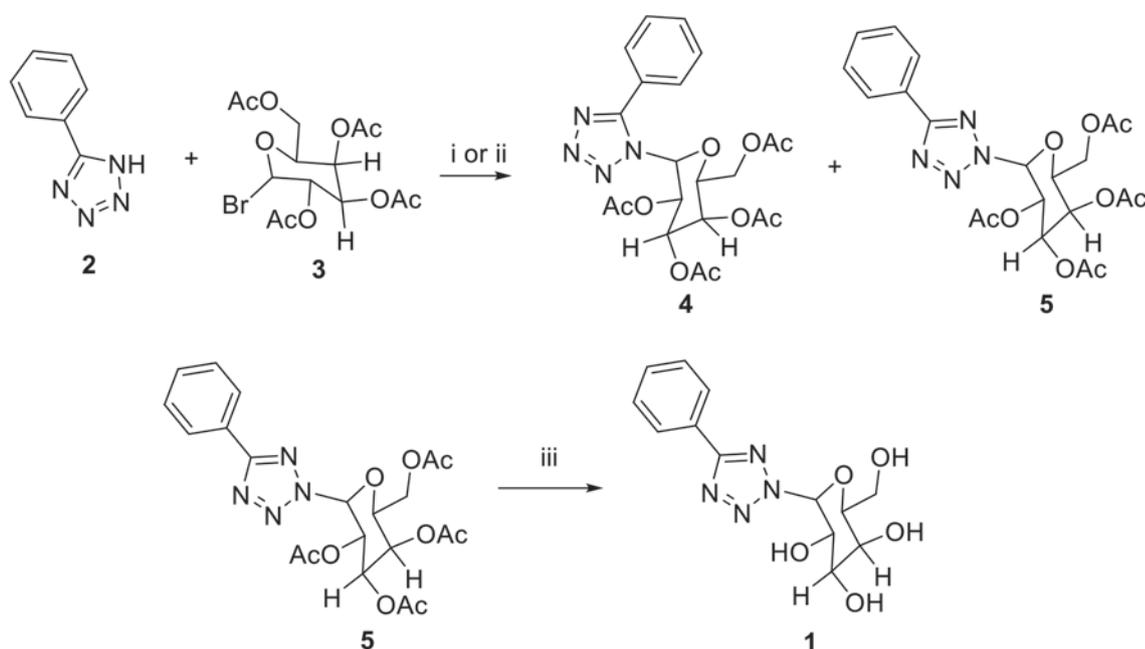
вода». В качестве катализатора межфазного переноса применяли бромистый триэтилбензиламмоний (ТЕВАВ) (схема 1, условия ii).

Для лучшего понимания протекания данного процесса в условиях межфазного катализа рассмотрим цикл Старкса [22, 23] (схема 2).

В водной фазе происходит обмен катионами между натриевой солью 5-фенилтетразола и ТЕВАВ с образованием триэтилбензиламмониевой соли 5-фенилтетразола. Последняя «проникает» в органический слой (хлороформ) через границу раздела фаз, где и вступает в реакцию с 1- $\alpha$ -бром-2,3,4,6-тетра-О-ацетил-D-галактопиранозой

3. Каталитический цикл завершается «возвращением» ТЕВАВ в водный слой.

Как видно из схем 1 и 2, продуктами реакции вне зависимости от условий проведения реакции являются два региоизомера 4 и 5. Вместе с тем, проведение синтеза в условиях межфазного катализа имеет ряд преимуществ, таких как доступность реагентов, безопасность, пригодность к масштабированию. Целевой региоизомер — 1-(5-фенил-2H-тетразол-2-ил)-2,3,4,6-тетра-О-ацетил- $\beta$ -D-галактопираноза 5 был выделен из реакционной массы с помощью колоночной хроматографии.



i, anhydr. acetone, dried  $K_2CO_3$ , reflux 8h, column chromatography (hexane-acetone=3:1), yield, **4** (17%), **5** (79%) [10];

ii, ТЕВАВ, NaOH,  $CHCl_3 - H_2O$ , 35°C, 8h, column chromatography (hexane-acetone=3:1), yield, **5** (70%), this work;

iii, MeOH, a few drops 1M solution NaOMe/MeOH, Amberlyst 15 (hydrogen form), column chromatography (hexane-acetone=3:1, yield **1**, 85% [10].

**Схема 1.** Синтез  $\beta$ -(2R,3R,5R)-2-(ацетоксиметил)-6-(5-фенил-2H-тетразол-2-ил) тетрагидро-2H-пиран-3,4,5-триил триацетата **5**: i — в гомогенных условиях по данным работы [10]; ii — в условиях межфазного катализа (настоящая работа); iii — удаление защитных групп соединения **5** с образованием  $\beta$ -(2R,3S,5R)-2-(гидроксиметил)-6-(5-фенил-2H-тетразол-2-ил) тетрагидро-2H-пиран-3,4,5-триола **1**

**Scheme 1.** Synthesis of  $\beta$ -(2R,3R,5R)-2-(acetoxymethyl)-6-(5-phenyl-2H-tetrazol-2-yl) tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triyl triacetate **5**: i — under homogeneous conditions according to the data from reference [10]; ii — under conditions of heterogeneous catalysis (current work); iii — removal of protective groups from compound **5** to form  $\beta$ -(2R,3S,5R)-2-(hydroxymethyl)-6-(5-phenyl-2H-tetrazol-2-yl) tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triol **1**

**Экспериментальная часть**

Спектры ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  записывали на спектрометре Bruker DPX-400 (с рабочими частотами на ядрах  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  400,13 и 100,6 МГц соответственно). В качестве растворителя при записи спектра синтезированных соединений использовали сигнал растворителя ДМСО- $d_6$  ( $\delta$ , м.д.: 2,50 и 39,52 для ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  соответственно).

Температуру плавления определяли на приборе марки ПТП со скоростью нагрева  $1^\circ\text{C}$  в минуту в интервале плавления.

В качестве перемешивающих устройств использовали магнитную мешалку IKA C-MAG HS 7 и диспергатор IKA T18 basic ULTRA-TURRAX.

ТСХ проводили на пластинах Merck Kieselgel 60F254 с проявлением пятен под УФ-лампой ( $\lambda$  254 нм).

Для отгонки растворителей использовали роторный испаритель LABOROTA – 4002 – digital WB.

Колоночную хроматографию проводили на сорбенте силикагель SiliaFlash Irregular Silica Gel GE60 с применением элюента гексан-ацетон = 3:1. Параметры колонки:  $h = 30$  см,  $d = 2$  см.

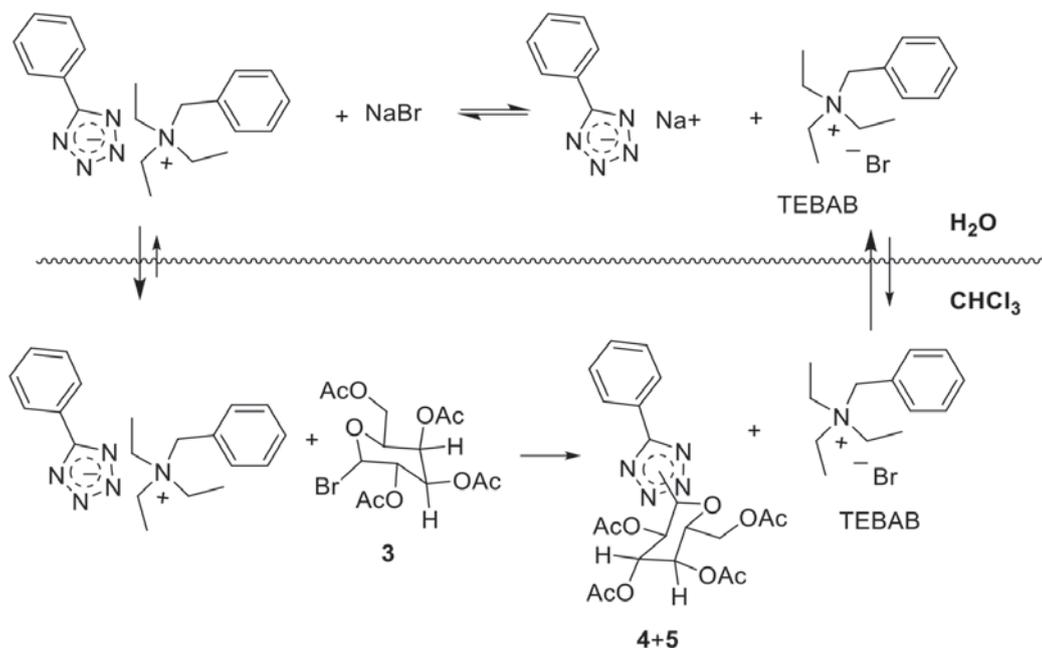
Масс-спектр записывали на жидкостном хромато-масс-спектрометре (ВЖХ-МС) HP 1200

фирмы Agilent с масс-спектрометрическим детектором TripleQuard 6460 с источником ионизации «электроспрей» (ESI), растворитель — метанол.

Спектры ИК записывали на ИК-Фурье спектрометре Shimadzu FTIR-8400+ в таблетках KBr.

 **$\beta$ -(2R,3R,5R)-2-(ацетоксиметил)-6-(5-фенил-2H-тетразол-2-ил) тетрагидро-2H-пиран-3,4,5-триилтриацетат 5**

К смеси 1 г (2,43 ммоль) 1- $\alpha$ -бром-2,3,4,6-тетраацетил-D-галактопиранозы, 0,55 г (2,02 ммоль) триэтилбензиламмония бромида и 25 мл хлороформа прибавляли раствор 0,7 г (4,79 ммоль) 5-фенилтетразола, в 8,9 г 0,6 н. водного раствора гидроксида натрия. Двухфазную систему нагревали до  $35^\circ\text{C}$  при интенсивном перемешивании в течение 8 ч. с применением высокоскоростного диспергатора (3000 об. мин.). После охлаждения до комнатной температуры отделяли водную фазу, органическую промывали в делительной воронке 5%-ным водным раствором гидрокарбоната натрия (3 x 25 мл), затем дистиллированной водой (2 x 25 мл) и сушили безводным сульфатом магния. После сушки хлороформ удаляли на ро-



**Схема 2.** Цикл Старкса для алкилирования натриевой соли 5-фенилтетразола 2 1- $\alpha$ -бром-2,3,4,6-тетра-О-ацетил-D-галактопиранозой 3. Двухфазная система «хлороформ — вода»; катализатор межфазного переноса: триэтилбензиламмоний бромистый (TEBAB)

**Scheme 2.** Starks cycle for alkylation of the sodium salt of 5-phenyltetrazole 2 1- $\alpha$ -bromine-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-D-galactopyranose 3. Two-phase system “chloroform — water”; interphase transfer catalyst: triethylbenzylammonium bromide (TEBAB)

торном испарителе. Разделение региоизомеров **4** и **5** (схема 1, условия ii) выполняли с помощью колоночной хроматографии. Выход соединения **5** 0,8 г (70 %), т. пл. 125–127 °С.  $R_f = 0,79$  (дихлорметан–метанол = 97:3 (25°C)). Спектр ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $\delta$ , м.д. [DMSO-d<sub>6</sub>]: 8,22–8,20 (2H, м, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 7,55–7,51 (3H, м, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 6,16–6,10 (2H, д, H<sub>2,4</sub>-Glu), 5,6–5,59 (1H, д, 1H-Glu), 5,34–5,29 (2H, д, 3H-Glu), 4,34–4,30 (1H, д, 5H-Glu), 4,28–4,17 (углеводы), 2,29 (3H, с, CH<sub>3</sub>CO), 2,18 (3H, с, CH<sub>3</sub>CO), 2,07 (3H, с, CH<sub>3</sub>CO), 2,05 (3H, с, CH<sub>3</sub>CO), 1,86 (2H, с, CH<sub>2</sub>). Спектр ЯМР  $^{13}\text{C}$ ,  $\delta$ , м.д. [DMSO-d<sub>6</sub>]: 170,37 (C=O), 170,25 (C=O), 170,01 (C=O), 168,24 (C=O), 165,74 (C=O), 132,45 (C<sup>4</sup>-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 130,91–130,83 (C<sup>5</sup>-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 128,85–128,81 (C<sup>6</sup>-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 127,22–126,69 (C<sup>1</sup>-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 87,36 (C<sup>1</sup>-Glu), 74,11(C<sup>2</sup>-Glu), 71,29 (C<sup>4</sup>-Glu), 68,16–67,22 (C<sup>3</sup>-Glu), 66,79 (C<sup>5</sup>-Glu), 61,23 (CH<sub>2</sub>), 22,3 (CH<sub>3</sub>), 20,76 (CH<sub>3</sub>), 20,67 (CH<sub>3</sub>), 20,55 (CH<sub>3</sub>). Масс-спектр, m/z: 475,9102 [M + Na] + (вычислено для C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>O<sub>9</sub>: 475,9102). ИК спектр,  $\nu$ , см<sup>-1</sup>: 1022–1468 тетразол (вал., вал-деф.), 1531 C-C (аромат.) фенильного кольца, 1750 C=O (ацетильная группа), 3450 C-H (аромат.).

**$\beta$ -(2R,3S,5R)-2-(гидроксиметил)-6-(5-фенил-2H-тетразол-2-ил) тетрагидро-2H-пиран-3,4,5-триол **1****

Удаление защитных ацетильных групп  $\beta$ -(2R,3R,5R)-2-(ацетоксиметил)-6-(5-фенил-2H-тетразол-2-ил) тетрагидро-2H-пиран-3,4,5-триилтриацетата **5**, выделение и очистку соединения **1** проводили в соответствии с данными работы (схема 1, условия iii) [10]. Выход и свойства целевого соединения **1** соответствуют литературным данным [10].

**Заключение**

Выполнен *in silico* прогноз биологической активности  $\beta$ -(2R,3S,5R)-2-(гидроксиметил)-6-(5-фенил-2H-тетразол-2-ил) тетрагидро-2H-пиран-3,4,5-триола **1**, в молекуле которого сочетаются тетразольное кольцо и галактопиранозный цикл. По данным компьютерного прогноза исследуемое соединение с высокой вероятностью способно проявлять мультитаргетную активность. Например, активность против диабета 2 типа. Предложен рациональный метод синтеза соединения **1**, который может быть воспроизведен не только в лабораторном масштабе, но также в условиях опытно-промышленного производства [24].

Результаты данного исследования позволяют рекомендовать  $\beta$ -(2R,3S, 5R)-2-(гидроксиметил)-6-(5-фенил-2H-тетразол-2-ил) тетрагидро-2H-пиран-3,4,5-триол **1** для тестирования

*in vitro, in vivo* активности в профильных научных центрах. Планируется передача образцов соединений для исследования биологической активности в Центр экспериментальной фармакологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский химико-фармацевтический университет» Минздрава России, ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера», в ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. ак. И. П. Павлова» Минздрава России.

**Конфликт интересов / Conflict of interest**

Авторы заявили об отсутствии потенциально-го конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

**Благодарности / Acknowledgments**

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 20-53-05010 Arm\_a, 20RF-138). / The study was carried out with the financial support by the Russian Foundation for Basic Research (project 20-53-05010 Arm\_a, 20RF-138).

**Список литературы / References**

1. The action plan (“road map”) for the development of the production of small-tonnage chemicals in the Russian Federation for the period up to 2030 (approved by order of the Government of the Russian Federation of December 15, 2017 No. 2834-р). In Russian [План мероприятий («дорожная карта») по развитию производства малотоннажной химии в Российской Федерации на период до 2030 года (утв. распоряжением Правительства РФ от 15 декабря 2017 г. № 2834-р)].
2. Rao CS. The Chemistry of Process Development in Fine Chemical and Pharmaceutical Industry, 2nd Edition. Wiley, 2007. P. 1328. ISBN: 978-0-470-31995-6.
3. Popova EA, Trifonov RE, Ostrovskii VA. Tetrazoles for biomedicine. Russ. Chem. Rev. 2019;88(6):644–676. In Russian [Попова Е.А., Трифонов Р.Е., Островский В.А. Тетразолы для биомедицины. Успехи химии, 2019; 88(6):644–676]. DOI: 10.1070/RCR4864.
4. Huang X, Zhang B, Xu H. Synthesis of some monosaccharide-related ester derivatives as insecticidal and acaricidal agents. Bioorganic Med. Chem. Lett. 2017; 27(18):4336–4340. DOI: 10.1016/j.bmcl.2017.08.031.
5. El-Sayed HA, Moustafa AH, Haikal AE-FZ, et al. Synthesis, antitumor, and antimicrobial activity of 40(4-chlorophenyl)-3-cyano-2-( $\beta$ -O-glycosyloxy)-6-thien-2-yl)nicotinonitrile. Eur. J. Med. Chem. 2011;47(7):2948–2954. DOI: 10.1016/j.ejmech.2011.04.019.
6. Herr RJ. 5-Substituted-1H-tetrazoles as carboxylic acid isosteres: medicinal chemistry and synthetic methods.

- Bioorg. Med. Chem. 2002;10(11):3379–3393. DOI: 10.1016/S0968-0896(02)00239-0.
7. Ostrovskii VA, Popova EA, Trifonov RE. Tetrazoles. *Comprehensive Heterocyclic Chemistry IV*. Oxford: Elsevier. 2022;6:182–232. DOI: 10.1016/B978-0-12-818655-8.00131-1.
  8. Pevzner LM, Petrov ML, Erkhiteva EB, et al. Synthesis of glycosides with 4-(4-hydroxyphenyl)-1,2,3-thia- and -selenadiazole aglycones. *Russ. J. Gen. Chem.* 2019; 89:1038–1046. In Russian [Певзнер Л.М., Петров М.Л., Эрхитева Е.Б. и др. Синтез гликозидов с 4-(4-гидрокси-фенил)-1,2,3-тиа- и селенадiazольными агликонами. *Журнал общей химии.* 2019;89(7):038–1046]. DOI: 10.1134/S1070363219070089.
  9. Joubert P, Beaupere D, Wadouachi A, et al. *J. Nat. Products.* 2004; 67:348–351. DOI: 10.1021/np030281z.
  10. Kun S, Bokor É, Sipos Á, et al. Synthesis of New C- and N-β-D-Glucopyranosyl Derivatives of Imidazole, 1,2,3-Triazole and Tetrazole, and Their Evaluation as Inhibitors of Glycogen Phosphorylase. *Molecules.* 2018;23(3):666. DOI: 10.3390/molecules23030666.
  11. Kyriakis E, Karra AG, Papaioannou O, et al. The architecture of hydrogen and sulfur σ-hole interactions explain differences in the inhibitory potency of C-β-D-glucopyranosyl thiazoles, imidazoles and an N-β-D glucopyranosyl tetrazole for human liver glycogen phosphorylase and offer new insights to structure-based design. *Bioorg. Med. Chem.* 2019; 28(1):115196. DOI: 10.1016/j.bmc.2019.115196.
  12. Kubinyi H, Folkers G, Martin YC. *3D QSAR in Drug Design: ligand-protein interactions and molecular similarity.* Kluwer Academic Publishers, 2002. P. 428 p.
  13. Holtje H-D, Sippl V, Rognan D, et al. *Molekulyarnoe modelirovanie: teoriya i praktika.* 3rd Edition. Moscow: Binom Publ., 2015. P. 320. In Russian [Хельте Х.-Д., Зиппл В., Роган Д. и др. Молекулярное моделирование: теория и практика. 3-е изд. Москва: БИНОМ. Лаборатория знаний. 2015. С. 309].
  14. Poroikov VV. Computer-Aided Drug Design: from Discovery of Novel Pharmaceutical Agents to Systems Pharmacology. *Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry.* 2020;14(3):216–227. In Russian [Поройков В.В. Компьютерное конструирование лекарств: от поиска новых фармакологических веществ до системной фармакологии. *Биомедицинская химия.* 2020;66(1):30–41]. DOI: 10.1134/s1990750820030117.
  15. Lengauer T., Rarey M. Computational methods for biomolecular docking. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1996;6(3):402–406. DOI: 10.1016/S0959-440X(96)80061-3.
  16. Parthasarathy S, Cady RK, Kraushaar DS, et al. Inhibition of diacylglycerol: CDPcholine cholinephosphotransferase activity by dimethylaminoethylp-chlorophenoxyacetate. *Lipids.* 1978;13(2):161–164. DOI: 10.1007/bf02533260.
  17. Green BD, Flatt PR, Bailey CJ. Dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) inhibitors: a newly emerging drug class for the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes and Vascular Disease Research.* 2006;3(3):159–165. DOI: 10.3132/dvdr.2006.024.
  18. De Wilde AH, Zevenhoven-Dobbe JC, Beugeling C, et al. Coronaviruses and arteriviruses display striking differences in their cyclophilin A-dependence during replication in cell culture. *Virology.* 2018;517:148–156. DOI: 10.1016/j.virol.2017.11.022.
  19. Ostrovskii VA, Koren AO. Alkylation and Related Electrophilic Reactions at Endocyclic Nitrogen Atoms in the Chemistry of Tetrazoles. *Heterocycles.* 2000;53(6):1421–1448. DOI: 10.3987/rev-00-530.
  20. Greene Th, Wuts PGM. *Protected groups in Organic Synthesis.* Third Edition. John Willey & Sons, Inc. N.Y., Chichester, Brisbane, Toronto, Syngapore. 1999. P. 779.
  21. Dehmlow E, Dehmlow S. *Mezhfaznyy kataliz.* Moscow: Mir Publ., 1987. P. 485. In Russian [Демлов Э., Демлов З. Межфазный катализ. М.: Мир. 1987. С. 485].
  22. Koldobskii GI, Ostrovskii VA, Osipova TF. Phase transfer catalysis in the chemistry of heterocyclic compounds. A review. *Chem. Heterocycl. Compd.* 1983;19(11):1141–1154. In Russian [Колдобский Г.И., Островский В.А., Осипова Т.Ф. Межфазный катализ в химии гетероциклических соединений. *Химия гетероциклических соединений.* 1983;11:1443–1459]. DOI: 10.1007/bf00515343.
  23. Goldberg YuSh. Selected chapters of interfacial catalysis. Riga: Craftsmanship. 1989. P. 554. In Russian [Гольдберг Ю.Ш. Избранные главы межфазного катализа. Рига: Зинатне. 1989. С. 554].
  24. Ostrovskii VA. Flexible Production System “AZOLES.” *Izvestiya of Saint Petersburg State Technological Institute (Technical University).* 2013;28(47): 39–42. In Russian [Островский В.А. Гибкая производственная система «АЗОЛЫ». *Известия Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического университета).* 2013;28(47):39–42].

#### Информация об авторах:

Павлюкова Юлия Николаевна, к.х.н., доцент кафедры химии и технологии органических соединений азота ФГБОУ ВО «СПбГТИ (ТУ)»;

Певзнер Леонид Маркович, к.х.н., старший научный сотрудник кафедры органической химии ФГБОУ ВО «СПбГТИ (ТУ)»;

Гукова Полина Александровна, студент 5 курса ФГБОУ ВО «СПбГТИ (ТУ)», кафедра химии и технологии органических соединений азота;

Новожилова Дарья Дмитриевна, студент 3 курса ФГБОУ ВО «СПбГТИ (ТУ)», кафедра химии и технологии органических соединений азота;

Данагулян Геворг Грачевич, д.х.н., профессор Российско-Армянского (Славянского) университета, руководитель лаборатории химии азотистых гетероциклов;

Островский Владимир Аронович, д.х.н., профессор кафедры химии и технологии органических соединений азота ФГБОУ ВО «СПбГТИ (ТУ)».

**Authors information:**

Yulia N. Pavlyukova, Ph.D., Associate Professor, Department of Chemistry and Technology of nitrogen organic compounds, Saint Petersburg State Technological Institute (Technical University);

Leonid M. Pevzner, Ph.D., Senior Researcher, Department of organic chemistry, Saint Petersburg State Technological Institute (Technical University);

Polina A. Gukova, 5th-year student, Saint Petersburg State Technological Institute (Technical University), Department of Chemistry and Technology of nitrogen organic compounds;

Darya D. Novozhilova, 3rd-year student, Saint Petersburg State Technological Institute (Technical University), Department of Chemistry and Technology of nitrogen organic compounds;

Gevorg G. Danagulyan, D.Sc., Professor, Russian-Armenian (Slavonic) University, Head of laboratory of chemistry of nitrogen heterocycles;

Vladimir A. Ostrovskii, D.Sc., Professor, Department of Chemistry and Technology of nitrogen organic compounds, Saint Petersburg State Technological Institute (Technical University).

## ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ЛЕГКИХ ФУЛЛЕРЕНОВ В МЕДИЦИНЕ

Кукалия О. Н.<sup>1</sup>, Мещеряков А. А.<sup>1</sup>, Юрьев Г. О.<sup>1,2,3</sup>,  
Андоскин П. А.<sup>1,2</sup>, Семенов К. Н.<sup>1,2,4</sup>, Молчанов О. Е.<sup>2</sup>,  
Майстренко Д. Н.<sup>2</sup>, Мурын И. В.<sup>4</sup>, Шаройко В. В.<sup>1,2,4</sup>

### Контактная информация:

Юрьев Глеб Олегович,  
ФГБОУ ВО «СПбГМУ  
им. И. П. Павлова» Минздрава России,  
ул. Льва Толстого, д. 6–8,  
Санкт-Петербург, Россия, 197022.  
E-mail: glebbi407@mail.ru

Статья поступила в редакцию 01.09.2023  
и принята к печати 28.12.2023.

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий имени академика А. М. Гранова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

<sup>4</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

### Резюме

Одними из наиболее перспективных направлений использования фуллеренов и их производных являются биология и медицина. Это связано с тем, что фуллерены обладают высокой реакционной способностью благодаря наличию двойных связей, способных присоединять различные радикалы, и демонстрируют высокую антиоксидантную активность, способность проникать через липидный бислой, модулировать трансмембранный транспорт ионов. В обзоре рассмотрены основные биологические свойства водорастворимых производных легких фуллеренов, определяющие их применение в биомедицине.

**Ключевые слова:** аддукты фуллерена с аминокислотами, биосовместимость, карбоксилированный фуллерен, фуллерен, фуллеренол.

Для цитирования: Кукалия О.Н., Мещеряков А.А., Юрьев Г.О. и др. Перспективы применения водорастворимых производных легких фуллеренов в медицине. Трансляционная медицина. 2023;10(6):507-521. DOI: 10.18705/2311-4495-2023-10-6-507-521. EDN: JTTUSS

## PROSPECTS FOR THE APPLICATION OF WATER-SOLUBLE DERIVATIVES OF LIGHT FULLERENES IN MEDICINE

Oleg N. Kukalia<sup>1</sup>, Anatoly A. Meshcheryakov<sup>1</sup>, Gleb O. Iurev<sup>1,2,3</sup>, Pavel A. Andoskin<sup>1,2</sup>, Konstantin N. Semenov<sup>1,2,4</sup>, Oleg E. Molchanov<sup>2</sup>, Dmitry N. Maistrenko<sup>2</sup>, Igor V. Murin<sup>4</sup>, Vladimir V. Sharoyko<sup>1,2,4</sup>

<sup>1</sup> Academician I. P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint Petersburg, Russia

<sup>2</sup> Russian Scientific Center for Radiology and Surgical Technologies named after A. M. Granov, Saint Petersburg, Russia

<sup>3</sup> Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

<sup>4</sup> Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Gleb O. Iurev,  
Academician I. P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University,  
Lva Tolstogo str., 6–8, Saint Petersburg,  
Russia, 197022.  
E-mail: glebbi407@mail.ru

Received 01 September 2023; accepted  
28 December 2023.

### Abstract

One of the most promising areas for the use of fullerenes and their derivatives is biology and medicine. This is due to the fact that fullerenes are highly reactive due to the presence of double bonds capable of attaching various radicals, and demonstrate high antioxidant activity, the ability to penetrate through the lipid bilayer, and modulate transmembrane ion transport. The review considers the main biological properties of water-soluble derivatives of light fullerenes, which determine their application in biomedicine.

**Key words:** biocompatibility, carboxylated fullerene, fullerene, fullerene adducts with amino acids, fulleranol.

*For citation: Kukalia ON, Meshcheryakov AA, Iurev GO, et al. Prospects for the application of water-soluble derivatives of light fullerenes in medicine. Translyatsionnaya meditsina=Translational Medicine. 2023;10(6):507-521 (In Russ.) DOI: 10.18705/2311-4495-2023-10-6-507-521. EDN: JTTUSS*

Одними из наиболее перспективных направлений использования фуллеренов и их производных являются биология и медицина. Это связано с тем, что фуллерены обладают уникальными физико-химическими свойствами [1–6], высокой реакционной способностью благодаря наличию двойных связей, способных присоединять различные радикалы, и демонстрируют высокую антиоксидантную активность, способность проникать через липидный бислой, модулировать трансмембранный транспорт ионов [7–10].

Проблема растворимости фуллерена стоит особенно остро в связи с его потенциальным применением в медицине, в водной среде он практически нерастворим ( $< 10^{-11}$  г/л) [11, 12], что обусловлено его высокой гидрофобностью.

Большим достижением в химии фуллеренов является то, что в последние годы были разработа-

ны подходы, позволяющие синтезировать аддукты фуллерена с приемлемыми для медицинского применения показателями растворимости в воде: 10–200 мг/мл и более [13–15].

С начала открытия препаративного способа получения фуллерена актуальной задачей является синтез водорастворимых аддуктов фуллеренов, которые обладают широким спектром биологической активности: противоопухолевой [16], антивирусной [17, 18], антимикробной [19], антиоксидантной [20], нейропротекторной [21, 22], фотодинамической [23–26], мембранотропной [27], кроме того, они могут использоваться как ингибиторы ферментов и апоптоза, а также в качестве радиопротекторов.

Все это говорит о том, что фуллерены и их производные могут являться основой для создания новых высокотехнологичных медицинских

материалов и лекарственных препаратов [28–33]. Например, в работах [34, 35] показано, что производные фуллеренов могут являться стерическими ингибиторами протеазы вируса ВИЧ за счет встраивания в полость активного центра фермента.

#### Антиоксидантные и цитопротекторные свойства

В последнее десятилетие биологические свойства фуллеренолов стали предметом интенсивных исследований. Остановимся сначала на антиоксидантных и цитопротекторных свойствах одного из наиболее изученных аддуктов фуллеренов — полигидроксилированных фуллеренов (фуллеренолов). Фуллереновые аддукты можно считать перспективными соединениями для профилактики и коррекции ишемического повреждения. Известно, что радикалы кислорода играют важную роль в патогенезе ишемического и реперфузионного повреждения [36]. Именно поэтому большое количество исследований антиоксидантного действия различных функционализированных фуллеренов, в том числе и фуллеренолов, было проведено на модели ишемии-реперфузии. Например, антиоксидантная активность фуллеренола  $C_{60}(OH)_{18-20}$ , полученного согласно [37], была продемонстрирована в экспериментах по трансплантации тонкой кишки у собак. Установлено, что как при профилактических, так и при лечебных инъекциях он снижал уровень свободных радикалов, образующихся в результате постишемического реперфузионного повреждения. Такой же эффект фуллеренола  $C_{60}(OH)_{18-20}$  был продемонстрирован и при ишемическом реперфузионном повреждении кишечника.

Цай и соавторы [38] показали, что фуллеренол блокирует вызванное перекисью водорода ингибирование передачи сигналов нейронами гиппокампа крысы *in vitro*. Способность  $C_{60}(OH)_{24}$  захватывать нитроксильный радикал была продемонстрирована Мирковым и коллегами [39]. Предварительное введение крысам  $C_{60}(OH)_{24}$  предотвращало вызванное нитроксильным радикалом снижение активности ферментов, таких как каталаза, глутатионтрансфераза и глутатионпероксидаза. Также фуллеренол  $C_{60}(OH)_{24}$  ингибировал перекисное окисление липидов, проявляя тем самым свойства антиоксиданта. Эффект фуллеренола был сравним с действием такого известного антиоксиданта, как бутилгидрокситолуол. Имеются данные о том, что в тесте с использованием ксантин-ксантиноксидазной системы фуллеренол способен захватывать супероксидный анион-радикал [39]. В работе Жа и соавторов [40] было показано, что направленное биологическое действие и возможная токсич-

ность фуллеренола связаны с его локальным накоплением в клетке. Эти данные были получены при изучении влияния различных концентраций фуллеренола на культивируемые нейроны гиппокампа крысы. При этом фуллеренол в зависимости от концентрации либо способствовал гибели клеток, либо защищал их от повреждения. Одним из возможных механизмов антиоксидантного действия фуллеренола  $C_{60}(OH)_{24}$  является его стимулирующее влияние на транскрипционный фактор NRF2. NRF2 представляет собой фактор транскрипции, контролирующей экспрессию антиоксидантных ферментов. Например, авторы работы [41] представили данные, свидетельствующие о цитопротекторных и антиапоптотических свойствах фуллеренола  $C_{60}(OH)_{24}$ , обусловленных его способностью индуцировать NRF2-зависимую экспрессию генов, кодирующих ферменты гемоксигеназу-1, НАДФН: хининоксидоредуктазу 1 и  $\gamma$ -глутамилцистеин лигазу. Несмотря на то, что к настоящему времени установлены различные биологические эффекты фуллеренолов, мало что известно об их возможном генотоксическом действии. Анализ хромосомных aberrаций и блокирования цитокинеза показал, что фуллеренол  $C_{60}(OH)_{24}$  в концентрациях 11–221 мкМ не оказывает генотоксического действия на клетки яичников китайского хомячка [42].

Эффект захвата свободных радикалов и цитопротекторное действие трех образцов фуллеренолов ( $C_{60}(OH)_{6-12}$ ,  $C_{60}(OH)_{32-34} \cdot 7H_2O$  и  $C_{60}(OH)_{44} \cdot 8H_2O$ ) изучали на кератиноцитах человека (NaCaT), подвергшихся воздействию УФ-излучения [43]. Установлено, что повреждения NaCaT, вызванные действием УФБ (280–315 нм) или УФА (315–400 нм), сильнее подавлялись фуллеренолом с самым высоким содержанием гидроксильных групп:  $C_{60}(OH)_{44} \cdot 8H_2O$ . В результате УФБ-облучения в клетках NaCaT быстро повышался уровень внутриклеточного окислительного стресса, происходило образование циклобутанпиримидиновых димеров и конденсация хроматина. Все эти эффекты подавлялись в присутствии  $C_{60}(OH)_{44} \cdot 8H_2O$ . Таким образом, повреждающее действие УФБ-облучения на кератиноциты можно предотвратить с помощью фуллеренола  $C_{60}(OH)_{44} \cdot 8H_2O$ , цитопротекторный эффект которого связан с поглощением АФК.

При сравнении эффектов фуллеренола  $C_{60}(OH)_{18-20}$  с эффектами аскорбиновой кислоты с целью выяснения механизма ее антиоксидантного действия установлено, что оба соединения ингибируют пролиферацию гладкомышечных клеток сосудов крыс, гладкомышечных клеток коронарной артерии человека и некоторых других

типов клеток. Примечательно, что фуллеренол (в большей степени, чем аскорбиновая кислота) ингибировал аллоксан-индуцированное образование супероксидных анион-радикалов и дозозависимо снижал активность цитозольной протеинкиназы С и тирозиновой протеинкиназы [44]. Возможно, что подавление пролиферации сосудистых клеток фуллеренолом может быть, по крайней мере частично, связано с его способностью непосредственно ингибировать тирозиновую протеинкиназу. Известно, что полифенолы куркумин, эскулетин, скопарон и байкалеин ингибируют пролиферацию гладкомышечных и моноклеарных клеток сосудов *in vitro* [45–50]. Это указывает на сходство биологической активности фенолов и фуллеренола, который, в принципе, является полигидроксильрованным олефином.

Особый интерес представляют ярко выраженные прооксидантные свойства фуллеренов, позволяющие использовать их в качестве фотосенсибилизаторов для ФДТ. Благодаря фотодинамической активности фуллерены являются потенциальными противоопухолевыми агентами. ФДТ — метод локальной световой активации фотосенсибилизатора, накапливающегося в опухоли, который в присутствии тканевого кислорода приводит к развитию фотохимических реакций, разрушающих опухолевые клетки. При дефиците кислорода фуллерен способен продуцировать свободные радикалы, что также приводит к гибели клеточной линии аденокарциномы гортани человека (Нер-2) через каспаза-3-зависимый механизм [51].

В результате изучения механизмов противоопухолевого действия фуллеренов были получены данные о способности фуллеренов и их аддуктов вызывать повреждение нуклеиновых кислот. При этом как нативные фуллерены, солюбилизованные циклодекстрином [52], поливинилпирролидоном [53] и липосомами [54], так и химически модифицированные аддукты фуллерена [55] вызывали повреждение ДНК. Показано, что фуллерены могут вызывать разрыв цепи ДНК только при облучении УФ или видимым светом и в присутствии доноров электронов. В темноте повреждения ДНК не происходит, а в отсутствие донора электронов фотодинамическая эффективность фуллерена резко падает. Следует отметить, что повреждение ДНК происходит именно по остаткам гуанозина [56], причем повреждение может происходить как через синглетный кислород, так и через супероксидные анион-радикалы, в отсутствие кислорода повреждения не происходит [57]. Установлено, что механизм фотодинамического кислородопосредованного повреждения ДНК реализуется за счет ре-

акции циклоприсоединения молекулы кислорода к пуриновому основанию гуанозина с образованием нестабильного эндопероксида [58]. Протекание последующих реакций, а также состав конечных продуктов зависят от положения гуанозина в двойной цепи ДНК. Предпринимались попытки создать гибридную фуллеренол-олигонуклеотидную молекулу для адресной доставки и повреждения определенных участков ДНК за счет фотодинамического действия фуллереновой части.

Авторы [59] синтезировали тройные гибридные соединения олигонуклеотид- $C_{60}$ -триметоксииндол (антибиотик и противоопухолевый препарат дуокармицинового ряда) с целью специфического связывания с сайтами ДНК и образования устойчивых тройных спиралей. Показано, что эти соединения образуют с ДНК тройные спирали, но образующиеся при этом комплексы обладают низкой стабильностью. В результате фотовозбуждения фуллерен  $C_{60}$  и фуллеренол  $C_{60}(OH)_{18}$  могут генерировать активный кислород и вызывать значительное перекисное окисление липидов и окисление белков в мембранах. Помимо повреждения ароматических аминокислот в белках за счет реакции циклоприсоединения, синглетный кислород способен избирательно реагировать с аминокислотами цистеином и метионином, так как атомы серы в их составе имеют относительно высокую электронную плотность [60].

На микросомах печени крыс [61] показано, что фотоиндуцированное действие фуллеренола  $C_{60}(OH)_{18}$  превосходит действие фуллерена  $C_{60}$ , при этом повреждающим агентом в фотодинамическом эффекте  $C_{60}$  является синглетный кислород, а в случае фуллеренола — супероксидный анион-радикал. Эти явления можно предотвратить путем добавления в исследуемую систему эндогенных природных антиоксидантов (глутатиона, аскорбиновой кислоты и токоферола). Антиоксидантная активность обнаружена и у не менее перспективных аддуктов легких фуллеренов — карбоксилированных фуллеренов.

Ранее считалось, что *C3* изомер карбоксилированного фуллерена (рис. 1) проявляет свойства ловушки свободных радикалов [62, 63]. В работе [64] изучали фотоиндуцированную цитотоксичность дималоновой кислоты  $C_{60}$ , трималоновой кислоты  $C_{60}$  и квадромалоновой кислоты  $C_{60}$ . В культуре клеток HeLa все эти аддукты ( $C = 40$  мкМ) проявляли фотоиндуцированную цитотоксичность, уменьшающуюся с увеличением количества остатков малоновой кислоты. При отсутствии освещения никаких эффектов не наблюдалось. Дималоновая кислота  $C_{60}$  проявляла цитотоксический

эффект на клетки HeLa при освещении, и этот эффект дозозависимо усиливался с увеличением концентрации. Отмечено, что в результате фотоиндуцированного действия дималоновой кислоты  $C_{60}$  происходило значительное повреждение клеток. В отсутствие освещения цитотоксический эффект дималоновой кислоты  $C_{60}$  не наблюдался даже при концентрации 60 мкМ.

Авторы работы [65] сравнили цитопротекторную активность двенадцати водорастворимых аддуктов фуллерена  $C_{60}$  на эмбрионах рыб *Danio rerio*. Было установлено, что изомер карбоксилированного фуллерена C3 обладал наиболее сильным защитным действием на модели гентамицин-индуцированной цитотоксичности.

Следующий класс соединений с антиоксидантными свойствами — это фуллерены, функционализированные различными аминокислотами, пептидами и белками. Существует множество подходов к получению аминокислотных аддуктов фуллерена, включая прямое аминирование фуллерена аминокислотами [66–69].

Аддукты фуллеренов с пептидами благодаря наличию фуллеренового ядра обладают следующим набором свойств: трехмерная архитектура молекул, высокая липофильность, уникальные электронные свойства. И, наоборот, пептидная

составляющая обеспечивает структурное разнообразие в зависимости от длины и аминокислотного состава, реализацию различных зарядовых состояний, способность к молекулярному распознаванию. В настоящее время остается малоизученным вопрос о влиянии фуллеренового ядра на трансмембранный транспорт аддуктов, а также их влиянии на жизнеспособность клеток и антимикробную активность.

Белакович и коллеги [70] провели сравнительную оценку антиоксидантной активности N-замещенных фуллеропирролидинов, содержащих боковую пептидную цепь, с помощью антиоксидантного анализа FOX. Показано, что все соединения обладают более выраженной антиоксидантной активностью, чем витамин С.

Как известно, оксидативный стресс играет важную роль в развитии нейродегенеративных заболеваний. Исходя из этого, соединения, обладающие антиоксидантной активностью, привлекают внимание исследователей как потенциальные лекарственные средства для лечения нейродегенеративных заболеваний. В исследованиях [71, 72] показано, что нейропротекторная активность функционализированных фуллеренов обусловлена их способностью действовать как ловушки АФК. Имеются данные о корреляции между нейропро-

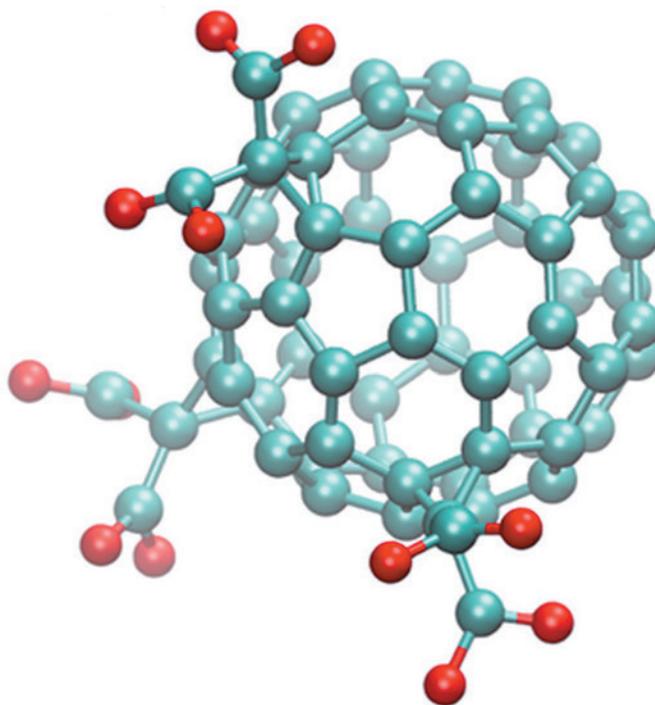


Рис. 1. C3 изомер карбоксилированного фуллерена

Figure 1. C3 isomer of carboxylated fullerene

текторной эффективностью различных карбокси-фуллеренов и их антиоксидантной активностью [73]. Были исследованы шесть различных карбоксифуллеренов, миметиков супероксиддисмутазы. В качестве модели для оценки структурно-функциональной взаимосвязи между реакционной способностью производных фуллеренов с супероксидами и защитой нейронов авторы рассматривали нейротоксичность, опосредованную NMDA-рецепторами, в которых участвуют внутриклеточные супероксиды. Установлена также корреляция между нейропротекторной активностью функционализированных фуллеренов и их дипольным моментом. В работе [74] утверждается, что карбоксифуллерен является перспективным терапевтическим средством для лечения болезни Паркинсона благодаря своим антиоксидантным свойствам, что было подтверждено в исследованиях *in vivo* на модели болезни Паркинсона у приматов (*Macaque fascicularis*).

Нейропротекторная активность аддуктов фуллеренов включает также антиамилоидное действие. Согласно «амилоидной гипотезе» возникновения и развития болезни Альцгеймера полимеризация и отложение  $\beta$ -амилоида является одной из основных причин, нарушающих функционирование, а впоследствии и целостность нейронов.

### Токсичность фуллеренов

Первые исследования токсичности фуллерена появились в 1995–1996 гг. [75, 76]. При изучении острой токсичности показано, что при введении мышам фуллерена в дозе 2,5 г/кг он не вызывал гибели и нарушений поведения подопытных животных в течение восьми недель. Многочисленные дальнейшие исследования также не выявили каких-либо нежелательных или токсических проявлений при действии фуллерена на организм. По токсикологической классификации вещества, проявляющие токсичность в дозах выше 1 г/кг, относятся к классу нетоксичных веществ. Таким образом, данные о введении фуллерена в дозе 2,5 г/кг свидетельствуют о том, что это нетоксичное соединение [77].

В работе [78] показано, что фуллерены не раздражают кожу и слизистые оболочки глаз, не проявляют сенсibiliзирующих свойств и не проникают в более глубокие слои кожи экспериментальных животных. Значимых токсических эффектов при пероральном введении фуллерена не наблюдается, что свидетельствует о низкой степени всасывания фуллерена из желудочно-кишечного тракта и его эффективном выведении.

При взаимодействии с водой фуллерен способен образовывать ассоциаты различного размера

и, соответственно, различной степени токсичности. Поэтому, наряду с повышением привлекательности фуллеренов для медицинского применения, существует также некоторая неопределенность в отношении их токсичности и последствий их использования. Функционализация  $C_{60}$  со снижением кажущейся токсичности может существенно повлиять на характер взаимодействия фуллеренов с биологическими системами [79]. При определенных условиях  $C_{60}$  может вызывать лизис эритроцитов человека в зависимости от дозы и времени, который можно было купировать введением N-ацетил-L-цистеина, что указывает на роль АФК в этом процессе [80]. Показано, что фуллерен  $C_{60}$  в виде водной коллоидной дисперсии не проявляет токсических свойств, а проявляет только антиоксидантные свойства [81]. Этот вывод основан на более чем десятилетних биологических испытаниях дисперсии фуллеренов в различных экспериментах *in vitro* и *in vivo*, не выявивших каких-либо токсических эффектов (при концентрациях  $C = 10^{-9}$ – $10^{-4}$  моль·л<sup>-1</sup> и при суммарных дозах до 25 мг/кг). Таким образом, приведенные выше данные, полученные разными исследователями на разных моделях *in vitro* и *in vivo*, свидетельствуют о том, что  $C_{60}$  при местном применении и внутрибрюшинном введении не проявляет острой токсичности.

Для изучения хронической токсичности был проведен длительный эксперимент на крысах [82], в рацион которых добавляли фуллерен в виде раствора в оливковом масле. В качестве контроля использовались диеты с добавлением только оливкового масла и воды. Фуллерен почти удвоил продолжительность жизни крыс.

Различные рационы не влияли на динамику массы животных, что также свидетельствует об отсутствии токсических эффектов у  $C_{60}$ . Анализ механизмов действия растворов  $C_{60}$  в оливковом масле на экспериментальной модели крыс с четыреххлористым углеродом показал, что влияние на продолжительность жизни связано в основном с подавлением окислительного стресса. Аналогичным действием обладает фуллеренол  $C_{60}(OH)_{22-24}$ . Крысам предварительно вводили  $C_{60}(OH)_{22-24}$ , а затем также подвергали воздействию четыреххлористого углерода, что приводило к образованию трихлорметильного радикала  $CCl_3\cdot$  [83]. Известно, что  $CCl_3\cdot$  в присутствии кислорода образует трихлорметилпероксирадикалы типа  $CCl_3OO\cdot$ , которые приводят к быстрому окислению жиров в клетках. Установлено, что предварительное введение фуллеренола  $C_{60}(OH)_{22-24}$  останавливало накопление сывороточных маркеров поражения этих

органов и, соответственно, развитие гистологических признаков поражения печени и почек. Кроме того, предварительная обработка фуллеренолом приводила к увеличению соотношения восстановленный/окисленный глутатион. Таким образом, фуллеренол  $C_{60}(OH)_{22-24}$ , являясь ловушкой для свободных радикалов, оказывает нефро- и гепатопротекторное действие, защищая клетки печени и почек от токсического действия четыреххлористого углерода.

Авторы [84] исследовали действие фуллеренола  $C_{60}(OH)_{24}$  на модели изолированной матки крысы. Использование раствора фуллеренола приводило к снижению активности Cu/Zn-супероксиддисмутазы и предотвращению индуцированного повышения активности глутатионредуктазы в присутствии диметилсульфоксида.

Авторы [85] охарактеризовали механизмы цитотоксичности фуллерена  $C_{60}$  и его полигидроксилированного аддукта фуллеренола в отношении различных клеточных культур: клеток фибросаркомы мыши L929, клеток глиомы крысы C6, клеток глиомы человека U251. Цитотоксичность фуллерена была выше, чем у фуллеренола, при этом  $C_{60}$  вызывал быстрый некроз (по механизму фотореактивного окисления) клеток без фрагментации ДНК, а фуллеренол индуцировал апоптоз, фрагментацию ДНК и повреждение клеточных мембран. Можно предположить, что в отличие от фуллерена, для которого фотоиндуцированная продукция свободных радикалов является основным механизмом действия на клетки, гидроксилированный аддукт в высоких дозах, по-видимому, влияет на внутриклеточные молекулярные механизмы апоптоза, связанные с ограниченными процессами протеолиза, запускаемыми активацией каспаз.

В экспериментах *in vivo* была показана потенциальная защитная функция фуллеренола  $C_{60}(OH)_{24}$  при токсическом воздействии доксорубина на клетки печени, почек и сердца [86–89]. Авторы установили, что фуллеренол проявляет свойства гепато-, кардио- и нефропротекторов.

Известно, что доксорубин является распространенным противоопухолевым препаратом, но его применение ограничено из-за его низкой селективности и кардиотоксичности. Показано, что конъюгат доксорубина с фуллереном  $C_{60}$  накапливается в ядрах опухолевых клеток значительно быстрее, чем доксорубин без вектора. Проникновение комплекса доксорубина с фуллереном в клетки увеличивается на 20–30 % по сравнению с таковым без фуллерена. В экспериментах *in vivo* на мышцах с перевитыми опухолями комплекс доксорубина с фуллереном  $C_{60}$  приводил к увеличе-

нию продолжительности жизни в 2,5 раза и уменьшению объема опухоли на 63 % по сравнению с индивидуальным доксорубином. Важно отметить, что повышение эффективности препарата не приводило к усилению побочных эффектов, что было показано морфологическим анализом.

Для определения потенциальной токсичности фуллеренолов остановимся на результатах работы [90], в которой эпидермальные кератиноциты человека подвергались воздействию фуллеренолов с низким ( $C_{60}(OH)_{20}$ ), средним ( $C_{60}(OH)_{24}$ ) и высоким ( $C_{60}(OH)_{32}$ ) содержанием гидроксильных групп в интервале концентраций  $C = 0.0005$ – $42.5$  мкг/мл в течение 24 и 48 часов. Статистически значимое снижение жизнеспособности клеток наблюдали только при использовании фуллеренола с высоким содержанием гидроксильных групп  $C_{60}(OH)_{32}$  при концентрации водного раствора  $C = 42.5$  мкг/мл через 24 часа. Авторы пришли к выводу, что различные аддукты гидроксилированных фуллеренов не вызывают воспалительного или цитотоксического действия при использовании растворов с концентрацией не более 8,55 мкг/мл.

Суй и коллеги [91] изучали влияние аддукта  $C_{60}$ -GluEG при различных концентрациях и инкубации в течение 12 и 24 часов на клеточную линию HeLa и показали, что  $C_{60}$ -GluEG также обладает низкой цитотоксичностью и высокой биосовместимостью.

Роуз и соавторы [92] исследовали влияние фуллеренового пептида (Vaa-Lys (FITC)-NLS) на клеточную линию HEK293 в диапазоне концентраций  $C = 0,00004$ – $0,4$  мг/мл. Обнаружено, что жизнеспособность клеток, измеренная методом МТТ через 48 часов инкубации, значительно снижается ( $p < 0,05$ ) при концентрациях Vaa-Lys (FITC)-NLS 0,04 и 0,4 мг/мл.

Лукафо и коллеги [93] провели *in vitro* исследование биологических свойств катионного аддукта фуллерена, относящегося к классу аминофуллеренов, на модели клеточной линии аденокарциномы молочной железы человека (MCF-7). При изучении цитотоксичности данный аддукт не вызывал клеточной гибели. Показано, что благодаря наличию гидрофильной цепи он проникает в клетки MCF-7 путем пассивной диффузии и равномерно распределяется в цитоплазме клеток. Он также не накапливается в ядре и органеллах независимо от времени экспозиции клеток. Катионный аддукт фуллерена не проникает в лизосомы и митохондрии клеток, что позволяет ограничить, а в некоторых случаях даже избежать его ферментативной деградации. В связи с этим функционализированные фуллерены имеют широкие перспективы ис-

пользования в качестве носителей для адресной доставки противоопухолевых препаратов к опухолевым клеткам.

Таким образом, при оценке токсичности фуллереновых аддуктов следует учитывать не только введенную дозу, но и ряд других параметров: степень агрегации, способ сольubilизации, наличие сорасстворителей, количество и структуру лигандов.

### Биодеградация фуллеренов

Известно, что углеродные наноструктуры, а именно нанотрубки и графен, подвергаются биодеградации [94]. Например, окисленные углеродные нанотрубки могут быть полностью разрушены растительными ферментами, такими как пероксидаза хрена и др. [95, 96]. В продуктах разложения были идентифицированы ароматические молекулы, такие как бензальдегид, бензиловый спирт, пирокатехин (1,2-дигидроксибензол) и флороглюцин (флороглюцин, 1,3,5-тригидроксибензол). В свою очередь, при изучении деградации фуллерена разные авторы отмечают стабильность фуллеренового ядра [97–105]. Даже использование фуллерена  $C_{60}$ , меченного атомами  $^{14}C$ , не позволило установить его детектируемую трансформацию в почве или в организме червей, а было отмечено, что захвату фуллерена и его биоаккумуляции препятствует размер самой молекулы [97]. Чрезвычайно медленная минерализация  $^{14}C-C_{60}$  в почве показана в работе [98], в которой также отмечено, что фуллерен  $C_{60}$  может накапливаться в растениях, особенно в корнях. При биодеградации фуллеренов преимущественно происходит промежуточное образование фуллеренолов [99–101]. Перечисленные работы свидетельствуют об устойчивости фуллерена  $C_{60}$  к действию биологических факторов. В ряде исследований отмечено, что в биологических системах фуллерен претерпевает изменения под действием различных веществ, при этом реакции протекают преимущественно на поверхности ядра с образованием эпоксидов, полуацеталей и гидроксильных аддуктов и не приводят к нарушению топологии молекулы [102–105].

Ранее было показано, что под влиянием миелопероксидазы, фермента нейтрофилов млекопитающих, происходит глубокая деградация молекул фуллерена  $C_{60}$  [106]. Наноразмерные молекулярные коллоидные дисперсии  $C_{60}$ , полученные путем смешивания  $C_{60}$  в растворе толуола с водой с использованием ультразвука, подвергались биодеградации [107]. Эта биодеградация, вызванная реакцией фуллерена с гипохлоритом, генерируемым ферментом, приводит к разрушению ядра фуллерена, признаками которого являются изме-

нение окраски раствора, исчезновение поглощения в области выше 300 нм электронного (УФ/видимого) спектра и исчезновение «фуллереновых» полос в ИК-спектрах [106].

Фотодеградация нанотрубок и фуллеренов под действием реактива Фентона изучалась в работах [108, 109]. В обоих случаях первыми стадиями процесса было гидроксильное окисление как фуллерена  $C_{60}$ , так и углеродных нанотрубок. Поэтому неудивительно, что последующие превращения приводят к полициклическим насыщенным аддуктам. В случае нанотрубок в качестве конечных продуктов отмечают 2-гидроксиэтан-1,1,2-трикарбоновую кислоту, щавелевую кислоту и продукты полного окисления —  $CO_2$  и  $H_2O$  [108]. В случае фуллерена  $C_{60}$  образующиеся полициклические фрагменты при раскрытии кольца приводят к образованию различных гидроксилзамещенных  $\alpha,\omega$ -дикислот, дальнейшее окисление которых приводит к образованию уксусной кислоты, этанола и пропилена, а также продуктов окисления [109].

### Радиопротекторные свойства

Фуллеренолы могут быть использованы в качестве радиопротекторов. В работе [110] сравнивали эффективность фуллеренола  $C_{60}(OH)_{24}$  ( $C = 10$  и  $100$  мг/кг) и стандартного радиопротектора амифостина ( $C = 300$  мг/кг) в защите крыс от воздействия ионизирующего излучения. Установлено, что фуллеренол лучше, чем амифостин предотвращает радиационно-индуцированное снижение уровня лейкоцитов (гранулоцитов и лимфоцитов), особенно в течение первых 7 дней после облучения. При патоморфологическом исследовании выявлено, что радиозащитное действие фуллеренола (по сравнению с амифостином) более выражено в селезенке, тонкой кишке и легких, при этом амифостин превосходит фуллеренол по радиозащитным свойствам при защите сердца, печени и почек.

Авторы [111] изучали способность фуллеренола  $C_{60}(OH)_{36}$  уменьшать повреждения, вызванные высокоэнергетическими электронами (6 МэВ) в мембранах эритроцитов человека. В результате проведенных исследований авторы обнаружили следующие эффекты: снижение пострадиационного гемолиза, оттока калия и окисления тиоловых групп, предотвращение радиационно-индуцированного повышения текучести мембран и изменения конформации белков. Сделан вывод, что радиозащитные свойства фуллеренола связаны с его способностью поглощать АФК.

Как отмечалось ранее, при определенных условиях аддукты фуллеренов способны защищать клетки от действия ультрафиолетового и других

видов излучения [112, 113]. Ху и соавторы [64] изучали биологические эффекты аддуктов фуллерена  $C_{60}$  с фолатом и аминокислотами L-фенилаланином и L-аргинином на опухолевой клеточной линии HeLa. Показано, что при облучении клеток HeLa видимым светом наблюдается снижение митохондриального мембранного потенциала, жизнеспособности клеток, активности ферментов СОД, каталазы, глутатионпероксидазы, что в совокупности приводит к активации каспазы-3 и, соответственно, к запуску программы апоптоза клеток.

Цзян и коллеги [114] изучали биологическое действие аддукта фуллерен-глицин на клеточных линиях HeLa и Lm8. В результате исследований установлено, что аддукт фуллерена с глицином при облучении ( $\lambda = 500\text{--}600$  нм) вызывает дозозависимую гибель клеточной линии Lm8 и индуцирует апоптоз в клеточной линии HeLa. По мнению авторов, гибель клеток происходит в основном за счет повреждения фосфолипидов и белков клеточных мембран. Под действием света аддукт фуллерена с глицином переходит из возбужденного синглетного состояния в возбужденное триплетное по механизму, свойственному немодифицированному фуллерену. Затем синглетный кислород мгновенно вступает в реакцию с белками, нуклеиновыми кислотами и фосфолипидами мембран, что приводит к повреждению и гибели клеток.

Одним из важнейших направлений современной медицинской химии и фармакологии является адресная доставка лекарств. Уникальные свойства наноматериалов на основе легких фуллеренов и их биологическая активность могут быть использованы для адресной доставки лекарств и вакцин в центральную нервную систему, для борьбы с онкологическими, кардиологическими и другими заболеваниями.

Аддукты фуллерена с аминокислотами эффективно проникают через гематоэнцефалический барьер и выступают переносчиками лекарственных препаратов к нервной ткани. В исследовании [115] *in vivo* на мышах и крысах показали, что комплекс фуллерена  $C_{60}$  с гексаметонием блокирует эффекты центрального *H*-холиномиметика никотина, проявляя противосудорожную активность и влияя на двигательную активность, вызванную введением никотина. Баланс гидрофильных и липофильных свойств надмолекулярного комплекса гексаметония с функционализированными фуллеренами предполагает возможность создания систем доставки полярных веществ в ЦНС на основе функционализированных молекул фуллерена  $C_{60}$ .

Способность аддуктов фуллерена с аминокислотами проникать через гематоэнцефалический

барьер и выступать переносчиками лекарственных средств в нервную ткань описана также в работе [116]. Авторы в экспериментах *in vitro* и *in vivo* установили, что аддукты фуллерена  $C_{60}$  с различными аминокислотами: — L-фенилаланином, L-серином и  $\beta$ -аланином и с остатками  $\gamma$ -фенилмасляной кислоты, подавляют пролиферацию клеток глиобластомы и снижают скорость их роста на модели рыб вида *Danio rerio*. Выявлено также, что аддукт фуллерена  $C_{60}$  с L-фенилаланином ингибирует рост глиобластомы, не замедляя восстановление нейронов и не влияя на нейрональные стволовые клетки. Предположительно, противоопухолевый механизм действия аддуктов фуллерена  $C_{60}$  с аминокислотами объясняется их участием в регуляции свободнорадикальных процессов. В частности, аддукт фуллерена  $C_{60}$  с  $\gamma$ -фенилмасляной кислотой оказывал существенное влияние на пролиферацию нервных стволовых клеток и их восстановление, не влияя на опухолевый рост. Стоит отметить, что поверхностные функциональные группы определяют свойства, а также взаимодействия аддуктов  $C_{60}$  с нейрональными стволовыми клетками и клетками глиомы. Авторы предположили, что различные концевые солубилизирующие группы могут влиять на растворимость, размер и самосборку водорастворимых аддуктов фуллерена с аминокислотами [116].

Фуллерены, функционализированные порфиринами, также обладают способностью доставлять лекарственные вещества. В работах [117, 118] были исследованы кардиопротекторные свойства  $^{25}\text{Mg-PMCl6}$ . Эти наночастицы, обладая низкой токсичностью, пригодны для адресной доставки в сердечную мышцу катионов  $^{25}\text{Mg}^{2+}$ , необходимых для активации синтеза АТФ.

### Заключение

Медицинское применение нанотехнологий привело к формированию нового междисциплинарного направления медицинской науки. Наиболее перспективными являются разработка технологий адресной доставки лекарств, создание противораковых и бактерицидных препаратов. В настоящее время мало известно о молекулярных механизмах действия на клетки человека новых синтетических наноструктур, в частности фуллеренов. Вместе с тем на функционализированные фуллерены возлагаются большие надежды в связи с их уникальными физико-химическими свойствами, такими как малый размер, антиоксидантные свойства, большое соотношение площади поверхности к массе. Несмотря на сложность функционализации, очистки и выделения фуллеренов, а также

противоречивость данных по их биологической активности, можно заключить, что, благодаря своим уникальным свойствам и практически неограниченной возможности функционализации, фуллерены и их производные могут совершить революцию в диагностике и терапии различных заболеваний и, возможно, изменить в лучшую сторону будущее всего человечества.

#### Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциально-го конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

#### Благодарности / Acknowledgments

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства здравоохранения Российской Федерации (государственное задание по теме «Разработка радиопротектора на основе водорастворимых форм наноуглерода, модифицированных L-аминокислотами. ЕГИСУ: 123020800170-8»). / The work was carried out with the financial support of the Ministry of Health of the Russian Federation (state assignment on the topic “Development of a radioprotector based on water-soluble forms of nanocarbon modified with L-amino acids. EGISU: 123020800170-8”).

#### Список литературы / References

- Podolsky NE, Marcos MA, Cabaleiro D, et al. Physico-chemical properties of C<sub>60</sub>(OH)<sub>22–24</sub> water solutions: Density, viscosity, refraction index, isobaric heat capacity and antioxidant activity. *J Mol Liq.* 2019 Mar; 278:342–55. DOI: 10.1016/j.molliq.2018.12.148.
- Serebryakov EB, Zakusilo DN, Semenov KN, et al. Physico-chemical properties of C<sub>70</sub>-l-threonine bisadduct (C<sub>70</sub>(C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>) aqueous solutions. *J Mol Liq.* 2019 Apr; 279:687–99. DOI: 10.1016/j.molliq.2019.02.013.
- Nikolaev DN, Podolsky NE, Lelet MI, et al. Thermodynamic and quantum chemical investigation of the monocarboxylated fullerene C<sub>60</sub>CHCOOH. *J Chem Thermodyn.* 2020 Jan; 140:105898. DOI: 10.1016/j.jct.2019.105898.
- Podolsky NE, Lelet MI, Ageev SV, et al. Thermodynamic properties of the C<sub>70</sub>(OH)<sub>12</sub> fullerene in the temperature range T = 9.2 K to 304.5 K. *J Chem Thermodyn.* 2020 May; 144:106029. DOI: 10.1016/j.jct.2019.106029.
- Podolsky NE, Lelet MI, Ageev SV, et al. Thermodynamic Properties from Calorimetry and Density Functional Theory and the Thermogravimetric Analysis of the Fullerene Derivative C<sub>60</sub>(OH)<sub>40</sub>. *J Chem Eng Data.* 2019 Apr 11; 64(4):1480–7. DOI: 10.1021/acs.jced.8b01075.
- Markin AV, Samosudova YS, Ogurtsov TG, et al. Heat capacity and standard thermodynamic functions of the fullerene C<sub>60</sub>(OH)<sub>24</sub>. *J Chem Thermodyn.* 2020 Oct; 149:106192. DOI: 10.1016/j.jct.2020.106192.
- Semenov KN, Charykov NA, Postnov VN, et al. Fullerenols: Physicochemical properties and applications. *Prog Solid State Chem.* 2016 Jun; 44(2):59–74. DOI: 10.1016/j.progsolidstchem.2016.04.002.
- Semenov KN, Andrusenko EV, Charykov NA, et al. Carboxylated fullerenes: Physico-chemical properties and potential applications. *Prog Solid State Chem.* 2017 Dec; 47–48:19–36. DOI: 10.1016/j.progsolidstchem.2017.09.001.
- Pochkaeva EI, Podolsky NE, Zakusilo DN, et al. Fullerene derivatives with amino acids, peptides and proteins: From synthesis to biomedical application. *Prog Solid State Chem.* 2020 Mar; 57:100255. DOI: 10.1016/j.progsolidstchem.2019.100255.
- Sharoyko VV, Ageev SV, Podolsky NE, et al. Biologically active water-soluble fullerene adducts: Das Glasperlenspiel (by H. Hesse) *J Mol Liq.* 2021 Feb; 323:114990. DOI: 10.1016/j.molliq.2020.114990.
- Bezmel'nitsyn VN, Eletsii AV, Okun' MV. Fullerenes in solutions. *Physics-Uspeski.* 1998 Nov 30; 41(11):1091–114. DOI: 10.1070/PU1998v041n11ABEH000502.
- Bagchi D. Bio-nanotechnology: a revolution in food, biomedical, and health sciences. Wiley-Blackwell, 2013. 803 p.
- Semenov KN, Charykov NA, Postnov VN, et al. Fullerenols: Physicochemical properties and applications. *Prog Solid State Chem.* 2016 Jun; 44(2):59–74. DOI: 10.1016/j.progsolidstchem.2016.04.002.
- Pochkaeva EI, Podolsky NE, Zakusilo DN, et al. Fullerene derivatives with amino acids, peptides and proteins: From synthesis to biomedical application. *Prog Solid State Chem.* 2020 Mar; 57:100255. DOI: 10.1016/j.progsolidstchem.2019.100255.
- Matsubayashi K, Kokubo K, Tategaki H, et al. One-step Synthesis of Water-soluble Fullerenols Bearing Nitrogen-containing Substituents. *Fullerenes, Nanotub Carbon Nanostructures.* 2009 Jul 1; 17(4):440–56. DOI: 10.1080/01490450903039263.
- Yang XL, Fan CH, Zhu HS. Photo-induced cytotoxicity of malonic acid [C<sub>60</sub>] fullerene derivatives and its mechanism. *Toxicol Vitro.* 2002 Feb; 16(1):41–6. DOI: 10.1016/S0887-2333(01)00102-3.
- Medzhidova MG, Abdullaeva MV, Fedorova NE, et al. In vitro antiviral activity of fullerene amino acid derivatives in cytomegalovirus infection. *Antibiot i khimioterapiia = Antibiot chemotherapy [sic].* 2004; 49(8–9):13–20.
- Lin Y-L, Lei H-Y, Wen Y-Y, et al. Light-Independent Inactivation of Dengue-2 Virus by Carboxyfullerene C<sub>3</sub> Isomer. *Virology.* 2000 Sep; 275(2):258–62. DOI: 10.1006/viro.2000.0490.
- Tsao N, Luh T-Y, Chou C-K, et al. Inhibition of Group A Streptococcus Infection by Carboxyfullerene.

- Antimicrob Agents Chemother. 2001 Jun;45(6):1788–93. DOI: 10.1128/AAC.45.6.1788-1793.2001.
20. Wang IC, Tai LA, Lee DD, et al. C 60 and Water-Soluble Fullerene Derivatives as Antioxidants Against Radical-Initiated Lipid Peroxidation. *J Med Chem*. 1999 Nov 1;42(22):4614–20. DOI: 10.1021/jm990144s.
21. Dugan LL, Turetsky DM, Du C, et al. Carboxyfullerenes as neuroprotective agents. *Proc Natl Acad Sci*. 1997 Aug 19;94(17):9434–9. DOI: 10.1073/pnas.94.17.9434.
22. Dugan LL, Lovett EG, Quick KL, et al. Fullerene-based antioxidants and neurodegenerative disorders. *Parkinsonism Relat Disord*. 2001 Jul;7(3):243–6. DOI: 10.1016/S1353-8020(00)00064-X.
23. Käsermann F, Kempf C. Buckminsterfullerene and photodynamic inactivation of viruses. *Rev Med Virol*. 1998 Jul;8(3):143–51. DOI: 10.1002/(sici)1099-1654(199807/09)8:3<143::aid-rmv214>3.0.co;2-b.
24. Vileno B, Sienkiewicz A, Lekka M, et al. In vitro assay of singlet oxygen generation in the presence of water-soluble derivatives of C60. *Carbon N Y*. 2004;42(5–6):1195–8. DOI: 10.1016/j.carbon.2003.12.042.
25. Fursov V, Namestnikova D, Kuznetsov DA. In Silico Track to Reveal a Translational Potential of Porphyrin-c60 Nanoparticles in the Ischemic Stroke Related Preclinical Studies. *Research Square*; 2022. DOI: 10.21203/rs.3.rs-2169685/v1.
26. Fursov VV, Zinchenko DI, Namestnikova DD, Kuznetsov DA. „IN SILICO ALGORITHM FOR OPTIMIZATION OF PHARMACOKINETIC STUDIES OF [25Mg2+]PORPHYRIN-FULLERENE NANOPARTICLES“ *Bulletin of Russian State Medical University*, no. 4, 2022. P. 58–63. DOI: 10.24075/brsmu.2022.037.
27. Andreev IM, Romanova VS, Petrukhina AO, et al. Amino-acid derivatives of fullerene C60 behave as lipophilic ions penetrating through biomembranes. *Phys. Solid State* 44, 683–685 (2002). <https://doi.org/10.1134/1.1470559>
28. Bhakta P, Barthunia B. Fullerene and its applications: A review. *Journal of Indian Academy of Oral Medicine and Radiology* 32(2):p 15963, Apr–Jun 2020. |DOI: 10.4103/jiaomr.jiaomr\_191\_19.
29. Hou W, Shi G, Wu S, et al. Application of Fullerenes as Photosensitizers for Antimicrobial Photodynamic Inactivation: A Review. *Front Microbiol*. 2022 Jul 14;13. DOI: 10.3389/fmicb.2022.957698.
30. Siringan MJ, Dawar A, Zhang J. Interactions between fullerene derivatives and biological systems. *Mater Chem Front*. 2023;7(11):2153–74. DOI: 10.1039/D3QM00004D.
31. Giannopoulos GI. Fullerene Derivatives for Drug Delivery against COVID-19: A Molecular Dynamics Investigation of Dendro[60]fullerene as Nanocarrier of Molnupiravir. *Nanomaterials*. 2022; 12(15):2711. <https://doi.org/10.3390/nano12152711>
32. Kazemzadeh H, Mozafari M. Fullerene-based delivery systems. *Drug Discov Today*. 2019 Mar;24(3):898–905. DOI: 10.1016/j.drudis.2019.01.013.
33. Fernandes NB, Shenoy RUK, Kajampady MK, et al. Fullerenes for the treatment of cancer: an emerging tool. *Environ Sci Pollut Res* 29, 58607–58627 (2022). <https://doi.org/10.1007/s11356-022-21449-7>
34. Friedman SH, DeCamp DL, Sijbesma RP, et al. Inhibition of the HIV-1 protease by fullerene derivatives: model building studies and experimental verification. *J Am Chem Soc*. 1993 Jul 1;115(15):6506–9. DOI: 10.1021/ja00068a005.
35. Friedman SH, Ganapathi PS, Rubin Y, Kenyon GL. Optimizing the binding of fullerene inhibitors of the HIV-1 protease through predicted increases in hydrophobic desolvation. *J Med Chem*. 1998;41(13):2424–2429. DOI: 10.1021/jm970689r.
36. Chien CT, Lee PH, Chen CF, et al. De Novo Demonstration and Co-localization of Free-Radical Production and Apoptosis Formation in Rat Kidney Subjected to Ischemia/Reperfusion. *J Am Soc Nephrol*. 2001 May;12(5):973–82. DOI: 10.1681/ASN.V125973.
37. Chiang LY, Upasani RB, Swirczewski JW. Versatile nitronium chemistry for C60 fullerene functionalization. *J Am Chem Soc*. 1992 Dec 1;114(26):10154–7. DOI: 10.1021/ja00052a010.
38. Tsai M-C, Chen YH, Chiang LY. Polyhydroxylated C60, Fullerenol, a Novel Free-radical Trapper, Prevented Hydrogen Peroxide- and Cumene Hydroperoxide-elicited Changes in Rat Hippocampus In-vitro. *J Pharm Pharmacol*. 2011 Apr 12;49(4):438–45. DOI: 10.1111/j.2042-7158.1997.tb06821.x.
39. Mirkov SM, Djordjevic AN, Andric NL, et al. Nitric oxide-scavenging activity of polyhydroxylated fullerenol, C60(OH)24. *Nitric Oxide*. 2004 Sep;11(2):201–7. DOI: 10.1016/j.niox.2004.08.003.
40. Zha YY, Yang B, Tang ML, et al. Concentration-dependent effects of fullerenol on cultured hippocampal neuron viability. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:3099–3109. DOI: 10.2147/IJN.S30934.
41. Ye S, Chen M, Jiang Y, et al. Polyhydroxylated fullerene attenuates oxidative stress-induced apoptosis via a fortifying Nrf2-regulated cellular antioxidant defence system. *Int J Nanomedicine*. 2014;9:2073–2087. Published 2014 Apr 29. DOI: 10.2147/IJN.S56973.
42. Mrđanović J, Šolajić S, Bogdanović V, et al. Effects of fullerenol C60(OH)24 on the frequency of micronuclei and chromosome aberrations in CHO-K1 cells. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen*. 2009 Nov;680(1–2):25–30. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2009.08.008.
43. Saitoh Y, Miyanishi A, Mizuno H, et al. Super-highly hydroxylated fullerene derivative protects human

keratinocytes from UV-induced cell injuries together with the decreases in intracellular ROS generation and DNA damages. *J Photochem Photobiol B*. 2011;102(1):69–76. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2010.09.006.

44. Lu LH, Lee YT, Chen HW, et al. The possible mechanisms of the antiproliferative effect of fullereneol, polyhydroxylated C<sub>60</sub>, on vascular smooth muscle cells. *Br J Pharmacol*. 1998;123(6):1097–1102. DOI: 10.1038/sj.bjp.0701722.

45. Huang HC, Jan TR, Yeh SF. Inhibitory effect of curcumin, an anti-inflammatory agent, on vascular smooth muscle cell proliferation. *Eur J Pharmacol*. 1992;221(2–3):381–384. DOI: 10.1016/0014-2999(92)90727-1.

46. Huang HC, Huang YL, Chang JH, et al. Possible mechanism of immunosuppressive effect of scoparone (6,7-dimethoxycoumarin). *Eur J Pharmacol*. 1992;217(2–3):143–148. DOI: 10.1016/0014-2999(92)90835-r.

47. Huang HC, Lee CR, Weng YI, et al. Vasodilator effect of scoparone (6,7-dimethoxycoumarin) from a Chinese herb. *Eur J Pharmacol*. 1992;218(1):123–128. DOI: 10.1016/0014-2999(92)90155-w.

48. Huang H-C, Hsieh L-M, Chen H-W, et al. Effects of baicalein and esculetin on transduction signals and growth factors expression in T-lymphoid leukemia cells. *Eur J Pharmacol Mol Pharmacol*. 1994 Jun;268(1):73–8. DOI: 10.1016/0922-4106(94)90121-X.

49. Huang H-C, Lai M-W, Wang H-R, et al. Antiproliferative effect of esculetin on vascular smooth muscle cells: possible roles of signal transduction pathways. *Eur J Pharmacol*. 1993 Jun;237(1):39–44. DOI: 10.1016/0014-2999(93)90090-.

50. Huang H-C, Wang H-R, Hsieh L-M. Antiproliferative effect of baicalein, a flavonoid from a Chinese herb, on vascular smooth muscle cell. *Eur J Pharmacol*. 1994 Jan;251(1):91–3. DOI: 10.1016/0014-2999(94)90447-2.

51. Alvarez MG, Prucca C, Milanese ME, et al. Photodynamic activity of a new sensitizer derived from porphyrin-C<sub>60</sub> dyad and its biological consequences in a human carcinoma cell line. *Int J Biochem Cell Biol*. 2006;38(12):2092–2101. DOI: 10.1016/j.biocel.2006.05.019.

52. Nakanishi I, Fukuzumi S, Konishi T, et al. DNA cleavage via electron transfer from NADH to molecular oxygen photosensitized by  $\gamma$ -cyclodextrin-bicapped C<sub>60</sub>. In: *Fullerenes for the New Millennium*. The Electrochemical Society, Inc., 2001. P. 138–51.

53. Yamakoshi Y, Umezawa N, Ryu A, et al. Active oxygen species generated from photoexcited fullerene (C<sub>60</sub>) as potential medicines: O<sub>2</sub><sup>-\*</sup> versus IO<sub>2</sub>. *J Am Chem Soc*. 2003;125(42):12803–12809. DOI: 10.1021/ja0355574.

54. Ikeda A, Doi Y, Hashizume M, et al. An Extremely Effective DNA Photocleavage Utilizing Functionalized Liposomes with a Fullerene-Enriched Lipid Bilayer. *J Am Chem Soc*. 2007 Apr 1;129(14):4140–1. DOI: 10.1021/ja070243s.

55. Ikeda A, Hatano T, Kawaguchi M, et al. Water-soluble [60]fullerene-cationic homooxalix[3]arene complex which is applicable to the photocleavage of DNA. *Chem Commun*. 1999;(15):1403–4. DOI: 10.1039/a903872h.

56. Bernstein R, Prat F, Foote CS. On the Mechanism of DNA Cleavage by Fullerenes Investigated in Model Systems: Electron Transfer from Guanosine and 8-Oxo-Guanosine Derivatives to C<sub>60</sub>. *J Am Chem Soc*. 1999 Jan 1;121(2):464–5. DOI: 10.1021/ja983335d.

57. Liu Y, Zhao Y-L, Chen Y, et al. A water-soluble  $\beta$ -cyclodextrin derivative possessing a fullerene tether as an efficient photodriven DNA-cleavage reagent. *Tetrahedron Lett*. 2005 Apr;46(14):2507–11. DOI: 10.1016/j.tetlet.2005.01.181.

58. Buchko GW, Wagner JR, Cadet J, et al. Methylene blue-mediated photooxidation of 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine. *Biochim Biophys Acta - Gene Struct Expr*. 1995;1263(1):17–24. DOI: [https://doi.org/10.1016/0167-4781\(95\)00078-U](https://doi.org/10.1016/0167-4781(95)00078-U)

59. Da Ros T, Spalluto G, Bourtoune A, Prato M. Current Chemistry: Fullerene Derivatives as Potential DNA Photoprobes. *Aust J Chem*. 2001 Aug 6;54:223–4. DOI: 10.1071/CH01058.

60. Davies MJ. Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;305(3):761–770. DOI: 10.1016/s0006-291x(03)00817-9.

61. Kamat JP, Devasagayam TPA, Priyadarsini KI, Mohan H. Reactive oxygen species mediated membrane damage induced by fullerene derivatives and its possible biological implications. *Toxicology*. 2000;155(1):55–61. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(00\)00277-8](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(00)00277-8)

62. Wang IC, Tai LA, Lee DD, et al. C<sub>60</sub> and Water-Soluble Fullerene Derivatives as Antioxidants Against Radical-Initiated Lipid Peroxidation. *J Med Chem*. 1999 Nov 1;42(22):4614–20. DOI: 10.1021/jm990144s.

63. Dugan LL, Turetsky DM, Du C, et al. Carboxyfullerenes as neuroprotective agents. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(17):9434–9439. DOI: 10.1073/pnas.94.17.9434.

64. Hu Z, Zhang C, Huang Y, et al. Photodynamic anticancer activities of water-soluble C(60) derivatives and their biological consequences in a HeLa cell line. *Chem Biol Interact*. 2012;195(1):86–94. DOI: 10.1016/j.cbi.2011.11.003.

65. Beuerle F, Witte P, Hartnagel U, et al. Cytoprotective activities of water-soluble fullerenes in zebrafish models. *J Exp Nanosci*. 2007 Sep 1;2(3):147–70. DOI: 10.1080/17458080701502091.

66. Liu Z, Zou Y, Zhang Q, et al. Distinct Binding Dynamics, Sites and Interactions of Fullerene and Fullerenols with Amyloid- $\beta$  Peptides Revealed by Molecular Dynamics Simulations. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019; 20(8):2048. <https://doi.org/10.3390/ijms20082048>

67. Piotrovsky LB, Kiselev OI. Fullerenes and Viruses. *Fullerenes, Nanotub Carbon Nanostructures*. 2005 Jan 2;12(1–2):397–403. DOI: 10.1081/FST-120027198.
68. Burley GA, Keller PA, Pyne SG. [60] Fullerene Amino Acids and Related Derivatives, *Fullerene Science and Technology*. 1999;7:6, 973–1001. DOI: 10.1080/10641229909350301.
69. Bianco A, Da Ros T, Prato M, Toniolo C. Fullerene-based amino acids and peptides. *J Pept Sci*. 2001;7(4):208–219. DOI: 10.1002/psc.313.
70. Bjelaković M, Kop T, Maslak V, et al. Synthesis and characterization of highly ordered self-assembled bioactive fulleropeptides. *J Mater Sci*. 2016; 51:739–747. DOI: 10.1007/s10853-015-9396-z.
71. Huang HM, Ou HC, Hsieh SJ, Chiang LY. Blockage of amyloid beta peptide-induced cytosolic free calcium by fullereneol-1, carboxylate C60 in PC12 cells. *Life Sci*. 2000;66(16):1525–1533. DOI: 10.1016/s0024-3205(00)00470-7.
72. Basso AS, Frenkel D, Quintana FJ, et al. Reversal of axonal loss and disability in a mouse model of progressive multiple sclerosis. *J Clin Invest*. 2008;118(4):1532–1543. DOI: 10.1172/JCI33464.
73. Ali SS, Hardt JI, Dugan LL. SOD activity of carboxyfullerenes predicts their neuroprotective efficacy: a structure-activity study. *Nanomedicine*. 2008;4(4):283–294. DOI: 10.1016/j.nano.2008.05.003.
74. Dugan LL, Tian L, Quick KL, et al. Carboxyfullerene neuroprotection postinjury in Parkinsonian nonhuman primates. *Ann Neurol*. 2014;76(3):393–402. DOI: 10.1002/ana.24220.
75. Moussa F, Chretien P, Dubois P, et al. The Influence of C 60 Powders On Cultured Human Leukocytes. *Fuller Sci Technol*. 1995 Jan;3(3):333–42. DOI: 10.1080/153638X9508543788.
76. Moussa F, Trivin F, Céolin R, et al. Early effects of C60 Administration in Swiss Mice: A Preliminary Account for In Vivo C60 Toxicity. *Fullerene Science and Technology*. 1996;4(1):21–29. DOI: 10.1080/10641229608001534.
77. Piotrovskii LB. Fullerenes in the drug design. *Nanotechnol Russia*. 2009;4:541–555. <https://doi.org/10.1134/S1995078009090018>
78. Hendrickson OD, Morozova OV, Zherdev AV, et al. Study of Distribution and Biological Effects of Fullerene C60 after Single and Multiple Intra-gastric Administrations to Rats, Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures. 2015;23(7):658–668. DOI: 10.1080/1536383X.2014.949695.
79. Gao J, Wang HL, Shreve A, Iyer R. Fullerene derivatives induce premature senescence: a new toxicity paradigm or novel biomedical applications. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2010;244(2):130–143. DOI: 10.1016/j.taap.2009.12.025.
80. Trpkovic A, Todorovic-Markovic B, Trajkovic V. Toxicity of pristine versus functionalized fullerenes: mechanisms of cell damage and the role of oxidative stress. *Arch Toxicol*. 2012;86(12):1809–1827. DOI: 10.1007/s00204-012-0859-6.
81. Andrievsky G, Klochkov V, Derevyanchenko L. Is the C60 Fullerene Molecule Toxic, Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures. 2005;13(4):363–376. DOI: 10.1080/15363830500237267.
82. Baati T, Bourasset F, Gharbi N, et al. The prolongation of the lifespan of rats by repeated oral administration of fullerene [published correction appears in *Biomaterials*. 2012 Sep;33(26):6292–4]. *Biomaterials*. 2012;33(19):4936–4946. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.03.036.
83. Xu J-Y, Su Y-Y, Cheng J-S, et al. Protective effects of fullereneol on carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats. *Carbon N Y*. 2010;48(5):1388–96. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2009.12.029>.
84. Slavic M, Djordjevic A, Radojicic R, et al. Fullereneol C60(OH)24 nanoparticles decrease relaxing effects of dimethyl sulfoxide on rat uterus spontaneous contraction. *J Nanopart Res* 15, 1650 (2013). <https://doi.org/10.1007/s11051-013-1650-1>
85. Isakovic A, Markovic Z, Todorovic-Markovic B, et al. Distinct cytotoxic mechanisms of pristine versus hydroxylated fullerene. *Toxicol Sci*. 2006;91(1):173–183. DOI: 10.1093/toxsci/kfj127.
86. Injac R, Perse M, Boskovic M, et al. Cardioprotective effects of fullereneol C(60)(OH)(24) on a single dose doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats with malignant neoplasm. *Technol Cancer Res Treat*. 2008;7(1):15–25. DOI: 10.1177/153303460800700102.
87. Djordjević-Milić V, Djordjević A, Dobrić S, et al. Influence of Fullereneol C60(OH)24 on Doxorubicin Induced Cardiotoxicity in Rats. *Mater Sci Forum*. 2006 Jul; 518:525–30. DOI: 10.4028/www.scientific.net/MSF.518.525.
88. Injac R, Boskovic M, Perse M, et al. Acute doxorubicin nephrotoxicity in rats with malignant neoplasm can be successfully treated with fullereneol C60(OH)24 via suppression of oxidative stress. *Pharmacol Rep*. 2008;60(5):742–749.
89. Injac R, Perse M, Obermajer N, et al. Potential hepatoprotective effects of fullereneol C60(OH)24 in doxorubicin-induced hepatotoxicity in rats with mammary carcinomas. *Biomaterials*. 2008;29(24–25):3451–3460. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2008.04.048.
90. Saathoff JG, Inman AO, Xia XR, et al. In vitro toxicity assessment of three hydroxylated fullerenes in human skin cells. *Toxicol In Vitro*. 2011;25(8):2105–2112. DOI: 10.1016/j.tiv.2011.09.013.
91. Xu D, Liu M, Huang Q, et al. A Novel method for the preparation of fluorescent C60 poly(amino acid) composites and their biological imaging. *J Colloid Interface Sci*. 2018;516:392–397. DOI: 10.1016/j.jcis.2018.01.085.

92. Rouse JG, Yang J, Barron AR, Monteiro-Riviere NA. Fullerene-based amino acid nanoparticle interactions with human epidermal keratinocytes. *Toxicol In Vitro*. 2006;20(8):1313–1320. DOI: 10.1016/j.tiv.2006.04.004.
93. Lucafò M, Pacor S, Fabbro C, et al. Study of a potential drug delivery system based on carbon nanoparticles: effects of fullerene derivatives in MCF7 mammary carcinoma cells. *J Nanoparticle Res*. 2012 Mar 28;14(4):830. DOI: 10.1007/s11051-012-0830-8.
94. Chen M, Qin X, Zeng G. Biodegradation of Carbon Nanotubes, Graphene, and Their Derivatives. *Trends Biotechnol*. 2017;35(9):836–846. DOI: 10.1016/j.tibtech.2016.12.001.
95. Allen BL, Kotchey GP, Chen Y, et al. Mechanistic Investigations of Horseradish Peroxidase-Catalyzed Degradation of Single-Walled Carbon Nanotubes. *J Am Chem Soc*. 2009 Dec 2;131(47):17194–205. DOI: 10.1021/ja9083623.
96. Kagan VE, Kapralov AA, St Croix CM, et al. Lung macrophages “digest” carbon nanotubes using a superoxide/peroxynitrite oxidative pathway. *ACS Nano*. 2014;8(6):5610–5621. DOI: 10.1021/nn406484b.
97. Li D, Fortner JD, Johnson DR, et al. Bioaccumulation of  $^{14}\text{C}_{60}$  by the Earthworm *Eisenia fetida*. *Environ Sci Technol*. 2010 Dec 1;44(23):9170–5. DOI: 10.1021/es1024405.
98. Avanası R, Jackson WA, Sherwin B, et al. C60 Fullerene Soil Sorption, Biodegradation, and Plant Uptake. *Environ Sci Technol*. 2014 Mar 4;48(5):2792–7. DOI: 10.1021/es405306w.
99. Navarro DA, Kookana RS, McLaughlin MJ, Kirby JK. Fate of radiolabeled C60 fullerenes in aged soils. *Environ Pollut*. 2017 Feb;221:293–300. DOI: 10.1016/j.envpol.2016.11.077.
100. Berry TD, Filley TR, Clavijo AP, et al. Degradation and Microbial Uptake of C60 Fullerenes in Contrasting Agricultural Soils. *Environ Sci Technol*. 2017 Feb 7;51(3):1387–94. DOI: 10.1021/acs.est.6b04637.
101. Navarro DA, Kookana RS, McLaughlin MJ, et al. Fullerol as a Potential Pathway for Mineralization of Fullerene Nanoparticles in Biosolid-Amended Soils. *Environ Sci Technol Lett*. 2016 Jan 12;3(1):7–12. DOI: 10.1021/acs.estlett.5b00292.
102. Tiwari AJ, Morris JR, Vejerano EP, et al. Oxidation of C60 aerosols by atmospherically relevant levels of  $\text{O}_3$ . *Environ Sci Technol*. 2014;48(5):2706–2714. DOI: 10.1021/es4045693.
103. Fortner JD, Kim D-I, Boyd AM, et al. Reaction of Water-Stable C60 Aggregates with Ozone. *Environ Sci Technol*. 2007 Nov 1;41(21):7497–502. DOI: 10.1021/es0708058.
104. Sanchís J, Aminot Y, Abad E, et al. Transformation of C60 fullerene aggregates suspended and weathered under realistic environmental conditions. *Carbon N Y*. 2018 Mar;128:54–62. DOI: 10.1016/j.carbon.2017.11.060.
105. Gitsov I, Simonyan A, Wang L, et al. Polymer-assisted biocatalysis: Unprecedented enzymatic oxidation of fullerene in aqueous medium. *J Polym Sci Part A Polym Chem*. 2012 Jan 23;50(1):119–26. DOI: 10.1002/pola.24995.
106. Litasova EV, Iljin VV, Sokolov AV, et al. The biodegradation of fullerene C60 by myeloperoxidase. *Dokl Biochem Biophys*. 2016;471(1):417–420. DOI: 10.1134/S1607672916060119.
107. Brant JA, Labille J, Bottero JY, Wiesner MR. Characterizing the impact of preparation method on fullerene cluster structure and chemistry. *Langmuir*. 2006;22(8):3878–3885. DOI: 10.1021/la053293o.
108. Li T, Zhang C-Z, Fan X, et al. Degradation of oxidized multi-walled carbon nanotubes in water via photo-Fenton method and its degradation mechanism. *Chem Eng J*. 2017 Sep;323:37–46. DOI: 10.1016/j.cej.2017.04.081.
109. Li T, Zhang C-Z, Ding D, et al. Experimental and theoretical study on degradation of oxidized C60 in water via photo-Fenton method. *Chem Eng J*. 2018 Feb;334:587–97. DOI: 10.1016/j.cej.2017.10.062.
110. Trajković S, Dobrić S, Jačević V, et al. Tissue-protective effects of fullerol C60(OH)24 and amifostine in irradiated rats. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2007;58(1):39–43. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2007.01.005.
111. Grebowski J, Kazmierska P, Litwinienko G, et al. Fullerol C60(OH)36 protects human erythrocyte membrane against high-energy electrons. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 2018;1860(8):1528–1536. DOI: 10.1016/j.bbmem.2018.05.005.
112. Orlova MA, Trofimova TP, Orlov AP, et al. Fullerene and apoptosis. *Oncohematology*. 2013;8(1):65–71. In Russian [Орлова М.А., Трофимова Т.П., Орлов А.П. и др. Фуллерены и апоптоз. Онкогематология. 2013;8(1):65–71]. DOI: 10.17650/1818-8346-2013-8-1-65-71.
113. Mroz P, Tegos GP, Gali H, et al. Photodynamic therapy with fullerenes. *Photochem Photobiol Sci*. 2007;6(11):1139–1149. DOI: 10.1039/b711141j.
114. Jiang G, Yin F, Duan J, Li G. Synthesis and properties of novel water-soluble fullerene-glycine derivatives as new materials for cancer therapy. *J Mater Sci Mater Med*. 2015;26(1):5348. DOI: 10.1007/s10856-014-5348-4.
115. Piotrovskiy LB, Litasova EV, Dumpis MA, et al. Enhanced brain penetration of hexamethonium in complexes with derivatives of fullerene C60. *Dokl Biochem Biophys*. 2016;468(1):173–175. DOI: 10.1134/S1607672916030030.
116. Hsieh FY, Zhilenkov AV, Voronov II, et al. Water-Soluble Fullerene Derivatives as Brain Medicine: Surface Chemistry Determines If They Are Neuroprotective and Antitumor. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2017;9(13):11482–11492. DOI: 10.1021/acsami.7b01077.
117. Rezayat SM, Boushehri SV, Salmanian B, et al. The porphyrin-fullerene nanoparticles to promote the ATP overproduction in myocardium:  $^{25}\text{Mg}^{2+}$ -magnetic isotope

effect. *Eur J Med Chem.* 2009;44(4):1554–1569. DOI: 10.1016/j.ejmech.2008.07.030.

118. Amirshahi N, Alyautdin RN, Sarkar S, et al. Fullerene-based low toxic nanocationite particles (porphyrin adducts of cyclohexyl fullerene-C(60)) to treat hypoxia-induced mitochondrial dysfunction in mammalian heart muscle. *Arch Med Res.* 2008;39(6):549–559. DOI: 10.1016/j.arcmed.2008.05.007.

#### Информация об авторах:

Кукалия Олег Нугзарович, врач, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова;

Мещеряков Анатолий Анатольевич, к.х.н., младший научный сотрудник, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова;

Юрьев Глеб Олегович, к.х.н., ассистент, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова;

Андоскин Павел Александрович, к.б.н., ассистент, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова;

Семенов Константин Николаевич, д.х.н., профессор, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова;

Молчанов Олег Евгеньевич, д.м.н., Российский научный центр радиологии и хирургических технологий им. акад. А. М. Гранова;

Майстренко Дмитрий Николаевич, д.м.н., Российский научный центр радиологии и хирургических технологий им. акад. А. М. Гранова;

Мурин Игорь Васильевич, д.х.н., профессор, Санкт-Петербургский государственный университет, Институт химии;

Шаройко Владимир Владимирович, д.б.н., профессор, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова.

#### Authors information:

Oleg N. Kukalia, MD, Academician I. P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University;

Anatoly A. Meshcheryakov, Ph.D., laboratory assistant, Academician I. P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University;

Gleb O. Iurev, Ph.D., assistant, Academician I. P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University;

Pavel A. Andoskin, Ph.D., assistant, Academician I. P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University;

Konstantin N. Semenov, D.Sc., prof., Academician I. P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University;

Oleg E. Molchanov, MD, PhD, Russian Scientific Center for Radiology and Surgical Technologies named after A. M. Granov;

Dmitry N. Maistrenko, MD, PhD, Russian Scientific Center for Radiology and Surgical Technologies named after A. M. Granov;

Igor V. Murin, D.Sc., prof., Saint Petersburg State University, Institute of Chemistry;

Vladimir V. Sharoyko, D.Sc., prof., Academician I. P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University.

## РАЗРАБОТКА ПРОТОТИПА ТЕРАНОСТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ КРЕМНЕЗЕМА С ИММОБИЛИЗИРОВАННЫМИ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМИ КРАСИТЕЛЯМИ И НАПРАВЛЯЮЩИМ ЛИГАНДОМ VEGF

Чебуркин Ю. В.<sup>1</sup>, Шульмейстер Г. А.<sup>1</sup>, Бондаренко А. Б.<sup>1,4</sup>,  
Чистякова А. В.<sup>2</sup>, Королев Д. В.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет «ЛЭТИ» имени В. И. Ульянова (Ленина)», Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

<sup>4</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

### Контактная информация:

Чебуркин Юрий Владимирович,  
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»  
Минздрава России,  
ул. Долгоозерная, д. 43, лит. А, Санкт-Петербург, Россия, 197349.  
E-mail: cheburkin\_yuv@almazovcentre.ru

*Статья поступила в редакцию 28.06.2023  
и принята к печати 18.10.2023.*

### Резюме

**Актуальность.** Введение некоторых лекарств вызывает нежелательные явления, связанные с системным воздействием действующего вещества на организм. Селективное нацеливание лекарственного средства на пораженную ткань способно избирательно повысить концентрацию вещества именно в зоне интереса, тем самым снизив системное влияние и усилив локальный терапевтический эффект. **Цель.** Создание средства направленной доставки тераностических агентов с использованием рекомбинантного фактора роста эндотелия сосудов типа А человека (rhVEGF-A121) в качестве направляющего лиганда. **Материалы и методы.** Для создания тераностического комплекса были использованы коммерчески доступные реактивы: рекомбинантный белок rhVEGF-A121 и пирогенный кремнезем Аэросил. Тозильный спейсер, соединяющий оба компонента, был синтезирован в условиях лаборатории. Конъюгация белка с флуорофорами также проводилась собственными силами. Для иммобилизации взяты индоцианин зеленый и Родамин Б. **Результаты.** В ходе работы проведена функционализация наночастиц кремнезема (НЧК) Аэросил тозильным спейсером, синтезированы конъюгаты НЧК с rhVEGF-A121, получены тераностические конструкции на основе НЧК, включающие rhVEGF-A121, в качестве направляющего

лиганда, и ИЦЗ/Родамин Б, в качестве визуализирующей метки. **Заключение.** В представленном исследовании разработан прототип средства направленной доставки тераностического агента в ткани с активно протекающим процессом ангиогенеза, например, в опухолевые и ишемизированные ткани. Для решения задачи проведена иммобилизация на поверхности наночастицы кремнезема (НЧК) направляющего лиганда, в качестве которого использован рекомбинантный белок фактора роста эндотелия сосудов человека (rhVEGF). Подобная синтетическая конструкция позволит доставлять диагностические и/или лекарственные вещества, заключенные в НЧК, непосредственно к клеткам, усиленно экспрессирующим экстрацеллюлярные специфические рецепторы для данного фактора роста, а именно протеин-тирозинкиназы семейства VEGFR. В последующих экспериментах *in vivo* оценка эффективности доставки будет оцениваться по накоплению в тканях флуорофоров ИЦЗ и Родамина Б, которые были конъюгированы с белком направляющего лиганда.

**Ключевые слова:** наночастицы кремнезема, направленная доставка, направляющий лиганд, тераностические агенты, функционализация наночастиц кремнезема, VEGF-A.

*Для цитирования:* Чебуркин Ю.В., Шулмейстер Г.А., Бондаренко А.Б. и др. Разработка прототипа тераностической системы на основе наночастиц кремнезема с иммобилизованными флуоресцентными красителями и направляющим лигандом VEGF. *Трансляционная медицина.* 2023;10(6):522-534. DOI: 10.18705/2311-4495-2023-10-6-522-534. EDN: JVUYKD

## DEVELOPMENT OF A PROTOTYPE OF A THERANOSTIC SYSTEM BASED ON SILICA NANOPARTICLES WITH IMMOBILIZED FLUORESCENT DYES AND VEGF TARGETING LIGAND

Yuri V. Cheburkin<sup>1</sup>, Galina A. Shulmeister<sup>1</sup>, Andrey B. Bondarenko<sup>1,4</sup>, Anastasia V. Chistyakova<sup>2</sup>, Dmitry V. Korolev<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

<sup>2</sup> Saint Petersburg Electrotechnical University "LETI", Saint Petersburg, Russia

<sup>3</sup> Academician I. P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint Petersburg, Russia

<sup>4</sup> Saint Petersburg State Pediatric Medical University, Saint Petersburg, Russia

**Corresponding author:**

Yuri V. Cheburkin,  
Almazov National Medical Research Centre,  
Dolgoozernaya str., 43, Saint Petersburg,  
Russia, 197349.  
E-mail: cheburkin\_yuv@almazovcentre.ru

Received 28 June 2023; accepted 18 October 2023.

### Abstract

**Background.** Administration of certain drugs causes undesirable effects associated with the systemic effect of the active substance on the entire body. Selective targeting of the drug to the affected tissue promotes a selective increase in the concentration of the substance in the area of interest, thereby reducing the systemic effect and enhancing the local therapeutic effect. **Objective.** Development of a targeted delivery system for theranostic agents using recombinant human vascular endothelial growth factor type A (rhVEGF-A121) as a targeting ligand. **Design and method.** To create the theranostic complex, commercially available reagents were used: the recombinant protein rhVEGF-A121 (cat.#: PSG140-10, LLC CyStorLab, Skolkovo, Russia) and fumed silica Aerosil (A-200, Degussa AG, Germany). The tosyl spacer that interconnects both components was synthesized in the laboratory. Protein conjugation with fluorophores was also carried out in-house. Indocyanine green (ICG;

Sigma-Aldrich, USA) and rhodamine B (JSC Lenreaktiv, St. Petersburg, Russia) were taken for immobilization. **Results.** In the course of the work, functionalization of silica nanoparticles (SiNPs) with a tosyl spacer was carried out, conjugates of SiNPs with rhVEGF-A121 were synthesized, and theranostic constructs based on SiNPs were obtained, including rhVEGF-A121 as a targeting ligand, and ICG/Rhodamine B as a visualizing label. **Conclusion.** In the presented study, a prototype of a complex for targeted delivery of a theranostic agent to tissues with an active angiogenesis process, for example, to tumor and ischemic tissues, was developed. To solve the problem, we immobilized on the surface of SiNP a recombinant protein of human vascular endothelial growth factor (rhVEGF) to use as a guide ligand. Such a synthetic construct will help to deliver diagnostic and/or medicinal substances packed in SiNP directly to cells that overexpress extracellular specific receptors of the VEGFR family. In subsequent in vivo experiments, delivery efficiency will be assessed by tissue accumulation of the fluorophores ICG and rhodamine B, which have been conjugated to the targeting ligand protein. The physicochemical characteristics of the obtained samples were studied by the methods of spectrophotometry and dynamic light scattering.

**Key words:** functionalization of silica nanoparticles, silica nanoparticles, targeted delivery, targeting ligand, theranostic agents, VEGF-A.

*For citation: Cheburkin YV, Shulmeister GA, Bondarenko AB, et al. Development of a prototype of a theranostic system based on silica nanoparticles with immobilized fluorescent dyes and VEGF targeting ligand. Translyatsionnaya meditsina=Translational Medicine. 2023;10(6):522-534 (In Russ.) DOI: 10.18705/2311-4495-2023-10-6-522-534. EDN: JVUYKD*

**Список сокращений:** ИЦЗ (ICG) — индоцианин зеленый, НЧК (SiNP) — наночастицы кремнезема, rhVEGF-A121 — рекомбинантный фактор роста эндотелия сосудов тип А, изоформа 121 человека, VEGF — фактор роста эндотелия сосудов, VEGFR — рецептор факторов роста эндотелия сосудов.

### Введение

Семейство факторов роста эндотелия сосудов (VEGF) объединяет в себе белки, регулирующие васкулогенез и ангиогенез в физиологических условиях, а также и при патологических состояниях, например, при опухолевом росте или иных процессах, связанных с неоваскуляризацией. Фактор роста эндотелия сосудов типа А (VEGF-A) представляет собой гомодимерный гликопротеин, специфичный для эндотелиальных клеток, существующий в различных изоформах, часть из которых утратила способность связываться с гепарином [1]. Кроме него в семейство VEGF входят белки VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D и плацентарный фактор роста. Биологические эффекты VEGF опосредованы связыванием этих лигандов с тремя рецепторными тирозинкиназами (VEGFR1 (Flt-1), VEGFR2 (KDR) и VEGFR3 (Flt-4)) и некоторыми несигнальными корецепторами, например, нейропилинами (NRP), модулирующими передачу сигналов с помощью VEGF [2, 3]. VEGF-A секретируется многими типами

нормальных клеток (например, эндотелиальными), а также опухолевыми клетками. Первоначально была показана роль VEGF-A в повышении проницаемости микрососудов [4], позже была установлена его функциональная способность стимулировать деление эндотелиоцитов [5, 6]. Биологическая активность VEGF-A в основном связана с проведением митогенного сигнала через VEGFR1 и VEGFR2 [7].

Наиболее распространенные изоформы VEGF-A, образующиеся в результате альтернативного сплайсинга, включают VEGF-A121, VEGF-A165, VEGF-A189 и VEGF-A206, где числовой индекс указывает на длину аминокислотной последовательности каждого белка: 121, 165, 189 и 206 аминокислотных остатков соответственно. Каждая изоформа имеет уникальные молекулярные характеристики; при этом VEGF-A165 является наиболее распространенной изоформой и обладает наилучшей биодоступностью и биоактивностью [8, 9]. Со стороны клетки-мишени важнейшую роль в процессе регуляции васкуло- и ангиогенеза играют рецепторы семейства VEGFR, имеющие структурные различия, которые определяют степень их избирательности и сродства к различным изоформам и типам VEGF [10].

Поскольку VEGF-A является ключевым регулятором ангиогенеза при росте солидных опухолей, снижение уровня VEGF-A стало инновационным терапевтическим подходом в онкологии и привело

к разработке первого антиангиогенного препарата Авастин (бевацизумаб), представляющего собой гуманизованное моноклональное антитело против VEGF-A, которое было одобрено FDA в качестве препарата первой линии для лечения метастатического колоректального рака [11, 12].

Тонкая настройка процесса ангиогенеза напрямую зависит от комбинаторики связывания различных изоформ (сплайс-вариантов) VEGF-A(xxx) и типов рецептора-мишени VEGFR(*n*). В работе S. В. Мамер и соавторов определены кинетика и аффинность связывания различных сплайс-вариантов лиганда с двумя типами рецептора. Кинетические константы были получены для каждой пары лиганд-рецептор. Было установлено сродство между VEGF-A121 и VEGFR1 с аффинностью  $K_D = 3,7$  nM, а также сродство VEGF-A121:VEGFR2 как  $K_D = 0,66$  nM. Для пары VEGF-A165:VEGFR1 и VEGF-A165:VEGFR2 аффинность по константе диссоциации составила 1,0 pM и 9,8 pM соответственно. Константы сродства ( $K_D$ ) рассчитывали как отношение скоростей ассоциации и диссоциации [13].

В нашем исследовании лиганд VEGF-A был использован для фиксации на наномерном носителе в качестве специфического молекулярного «проводника» к тканям с активным ангиогенезом, а значит, активно экспрессирующим на поверхности клеток рецепторы семейства VEGFR. В качестве пилотного эксперимента при разработке прототипа направляющего лиганда для тераностического препарата была использована изоформа-A121 рекомбинантного человеческого VEGF-A (rhVEGF-A121), обладающая достаточно высоким сродством к рецепторам 1 и 2 типа, активно участвующим в формировании капиллярной сосудистой сети. Нами сделано предположение, что использование НЧК с зафиксированным на поверхности направляющим лигандом (rhVEGF-A121) позволит обеспечивать таргетную доставку необходимых лекарственных средств, заключенных внутри наночастиц кремнезема (НЧК), к тканям, усиленно экспрессирующим VEGFR. Потенциальными мишенями для разрабатываемого тераностического агента могут являться как клетки эндотелия сосудов быстрорастущих солидных опухолей, так и ишемизированные ткани (например, при хронической ишемической болезни сердца, хронической артериальной недостаточности нижних конечностей, хронической ишемии головного мозга, кишечника и т. д.).

Наночастицы кремнезема состоят из диоксида кремния, самого распространенного соединения на Земле, и широко используются во многих областях, например, в пищевой промышленности, меди-

цинской диагностике, доставке лекарств, визуализации топологий [14]. НЧК обладают множеством преимуществ, таких как контролируемый размер частиц, большая удельная площадь поверхности и отличная биосовместимость. Методы синтеза НЧК являются технологичными. В многочисленных исследованиях показано биомедицинское применение НЧК, включая поверхностную и структурную модификацию для борьбы с различными видами патологий и диагностики заболеваний [15].

Направляющий лиганд и НЧК соединяли посредством синтетического тозильного спейсера, который обладает рядом преимуществ. Во-первых, для Аэросила, ввиду его химической инертности, возможна модификация различными методами, которые иногда неприменимы для магнитных или органических наночастиц. Помимо всего прочего, существуют работы, в которых этот носитель уже был использован для доставки лекарств [16–19]. Также нанопорошки Аэросила допущены для применения в качестве энтеросорбентов и абсолютно безопасны для организма [20, 21]. Для обозначения процесса фиксации лиганда на поверхности носителя в данной работе использовался термин «иммобилизация» [22].

Для иммобилизации действующего вещества на поверхности носителя используется, как правило, молекула-вставка, называемая спейсером. Такой молекулярный спейсер в химическом смысле — это подвижная часть молекулы, осуществляющая связь между двумя другими частями молекулы.

Иммобилизация действующего вещества посредством спейсера осуществляется при помощи функциональной группы, которой спейсер должен заканчиваться и которая определяет его химические свойства. Для органических соединений старшая функциональная группа соединения является критерием его отнесения к тому или иному классу и определяет его название по системе IUPAC.

Функциональная группа может обеспечивать различную природу химической связи спейсера с действующим веществом. По этому показателю классифицируют типы иммобилизации: адсорбционная, координационно-ионная и ковалентная. Есть типы связей, не попадающие в эту классификацию, например, дисульфидная. Тип иммобилизации крайне важен, так как влияет на скорость высвобождения действующего вещества и подбирается индивидуально.

Для изучения функциональной активности тераностического агента, основанного на лигандопосредованной доставке через систему рецепторов семейства VEGFR, можно применить модель хронического инфаркта миокарда у крыс. Для этого необходима достоверная визуализация внутритканевого

трафика тераностического агента. Реализация этой задачи проходит через функционализацию лиганда флуоресцентным красителем. На роль такого красителя хорошо подходит ИЦЗ (также известный как кардиогрин), поскольку он имеет полосы поглощения и испускания в ближней инфракрасной области спектра (700–900 нм), которая является прозрачной для биологических тканей. Кроме того, дополнительно можно иммобилизовать второй флуоресцентный краситель, имеющий какие-либо кислотные группы, на оставшиеся, не занятые аминокруппы белка. Конъюгация направляющего лиганда одновременно с двумя флуорофорами, отличающимися по длинам волн возбуждения и эмиссии, позволяет более точно определить захват молекулярного комплекса лиганд-флуорофор(ы)-НЧК тканями и детально проследить его дальнейшую судьбу. Кроме того, такой подход позволит использовать детектирующую аппаратуру с различными техническими характеристиками.

Создание конструкции rhVEGF-A121-НЧК — это лишь одна из ступеней развития технологии, использующей принцип доставки активного вещества с помощью наноносителя, функционализованного направляющим лигандом, в роли которого

могут выступать не только ростовые факторы, но и иные молекулы белковой и небелковой природы. Лекарственные и диагностические препараты, основанные на принципах активной лиганд-опосредованной доставки, внедряются в практический арсенал методов персонализированной терапии патологических состояний, при развитии которых в пораженной ткани обнаруживается специфически повышенная дифференциальная экспрессия отдельных поверхностных клеточных рецепторов. Включение синтетических лигандов к этим рецепторам в состав тераностического комплекса, на соответствующем уровне развития технологии, превращается в чисто техническую задачу.

Такого рода биотехнологические подходы к внедрению в клетку-мишень открывают широкие перспективы в лечении и диагностике целого ряда заболеваний, спектр которых не ограничен областями кардиологии или онкологии, но также распространяется и на другие разделы медицины. При этом очевидно, что широта применения подобных методов должна сочетаться с избирательностью воздействия на патологические процессы. Решению этих задач и посвящена представленная работа.

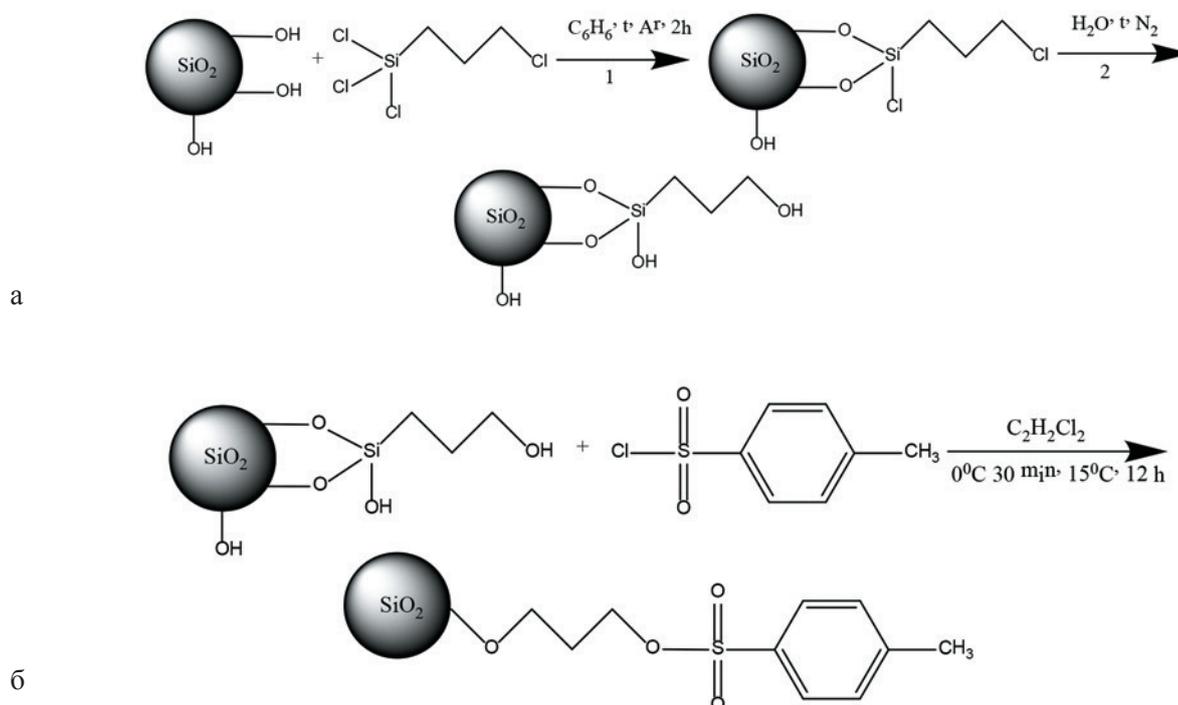


Рис. 1. Схема синтеза тозилowego спейсера: *a* — реакция с (3-хлорпропил)трихлорсиланом и гидроксילирование; *б* — реакция с пара-толуолсульфонилхлоридом

Figure 1. Scheme for the synthesis of a tosyl spacer: *a* — reaction with (3-chloropropyl)trichlorosilane and hydroxylation; *b* — reaction with para-toluenesulfonyl chloride

## Материалы и методы

### Используемые носитель и спейсер

В работе в качестве носителя действующего вещества использованы наночастицы кремнезема (НЧК), а именно пирогенный кремнезем Аэросил (А-200, Degussa AG, Германия). Для иммобилизации белка на поверхности НЧК формировался тозилый спейсер. Исходя из минимизации стадий синтеза, была выбрана схема синтеза тозилыого спейсера в три стадии (рис. 1):

— реакция гидроксильных групп НЧК с (3-хлорпропил)трихлорсиланом, проводилась: а) в бензоле, б) токе аргона при кипячении в течение 2 часов;

— гидролиз хлоридной группы в псевдокипящем слое в токе азота и патов воды;

— реакция гидроксильной группы с пара-толуолсульфонилхлоридом в дихлорэтано при температуре 15 °С в течение 12 часов.

В последующем продукт отмывали сначала циклогексаном, затем троекратно этанолом и лиофилизировали на лиофильной сушке VaCo-2 (ZirBus, Germany).

Соединение лиганда с носителем осуществили посредством тозилыого спейсера, синтезированного на НЧК в условиях лаборатории. Такой спейсер обеспечивает ковалентную иммобилизацию и максимально длительное время высвобождения действующего вещества, причем присоединение должно проходить по терминальной группе, не вызывая изменения конформации белка. Схема иммобилизации белка на такой спейсер на примере аминокислоты лизина приведена на рисунке 2.

### Рекомбинантный белок rhVEGF-A121

Для экспериментов был использован лиофильно высушенный рекомбинантный белок

rhVEGF-A121 (кат. №: PSG140-10, производитель ООО «СайСторЛаб», Сколково, РФ).

### Иммобилизация белка

10 мкг лиофильно высушенного белка rhVEGF-A121 разводили в 5 мл воды для инъекций. Из них 1 мл оставляли для контроля и разбавляли 1 мл воды для инъекций. Оставшиеся 4 мл использовали для иммобилизации белка. Для этого брали 10 мг Аэросила и заливали 4 мл водного раствора белка. Полученную суспензию перемешивали на орбитальном шейкере LS-220 (ЛОИП, РФ) в течение 1 часа при частоте 300 мин<sup>-1</sup>. Продукт промывали пятикратно дистиллированной водой при центрифугировании в течение 2 мин. при скорости 3000 мин<sup>-1</sup>. Каждый смыв сохраняли для исследования в нем количества белка. Затем образец вновь редиспергировали в 4 мл воды для инъекций.

### Изучение физико-химических характеристик образцов

Спектры поглощения образцов исследовались на двухлучевом спектрофотометре Unico 2802S (Unico Sys, США).

Размеры нанообъектов определялись методом динамического рассеяния света (DLS) на приборе Zeta Sizer Ultra (Malvern, США).

### Определение количества белка

В исходном растворе белка, каждом смыве и в конечном продукте количество белка определяли с помощью нингидриновой реакции, для чего Нингидрин растворяли в ацетоне в концентрации 0,2 % масс. Затем к 1 мл каждого образца добавляли 1 мл раствора Нингидрина. Полученную смесь кипятили на водяной бане в течение 10 мин. После естественного охлаждения смеси до комнатной

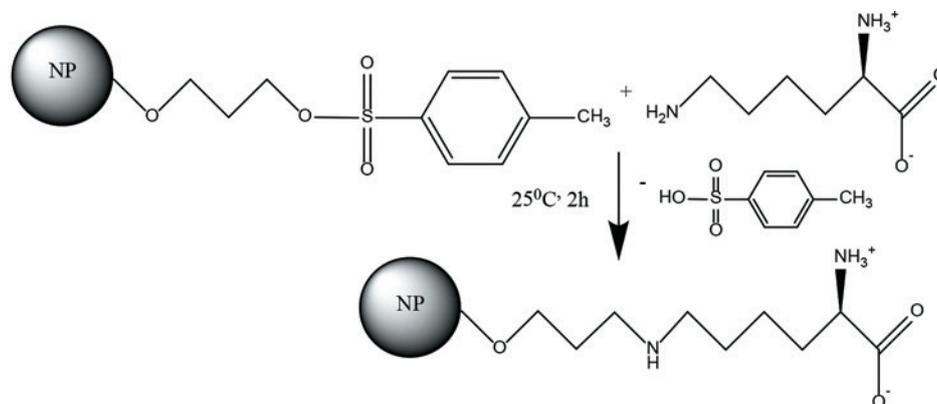


Рис. 2. Схема иммобилизации белка на тозилый спейсер на примере аминокислоты лизина

Figure 2. Scheme of protein immobilization on a tosyl spacer using the example of the amino acid lysine

температуры образцы анализировали на спектрофотометре Unico 2802s (Unico Sys., США) на длине волны 339 нм, что соответствует длине поглощения пролина.

**Иммобилизация флуорофоров**

Иммобилизация флуорофоров, ИЦЗ и Родамина Б проводилась по одинаковой схеме. В 15 мл пробирку, содержащую суспензию образца А-200-тозил-rhVEGFA121, добавляли 2 мл водного раствора флуорофора (1 мг/мл). Образец перемешивали на орбитальном шейкере при скорости 300 мин.<sup>-1</sup> в течение 1 часа. Затем образец промывался до визуально прозрачной надосадочной жидкости с центрифугированием в течение 10 мин. на скорости 3000 мин.<sup>-1</sup>. В результате получали образец А-200-тозил- rhVEGFA121-ИЦЗ или А-200-тозил-rhVEGF A121-ИЦЗ-Родамин Б соответственно.

**Результаты**

Средний размер молекул белка составил 170 нм (рис. 3), средний размер исходных наночастиц Аэросила составил 230 нм. При синтезе спейсера на поверхности наночастиц их размер увеличился до 270 нм, а при иммобилизации белка — до 900 нм. Также в конечном образце наблюдалось некоторое количество «неотмытого» свободного белка. Этим объясняется двумодальное распределение нанообъектов по размерам.

Количество иммобилизованного и свободного белка определялось спектрофотометрически на длине волны 339 нм, что соответствует длине волны пролина, и эта полоса наиболее выражена на спектрах поглощения (рис. 4).

Содержание чистого белка в контрольном (исходном) образце составило 2 мкг/мл (табл. 1). В смывах от 1 по 5 концентрация белка сначала растет, а затем уменьшается. Концентрация связанного на поверхности наночастиц белка составила 0,503 мкг/мл. Сумма количества белка в смывах и связанного белка примерно равна исходному количеству белка, соотношение связанного и несвязанного белка составляет 1:3.

ИЦЗ был иммобилизован сульфогруппами на аминокислоты в боковых цепях аминокислот белка, как показано на рисунке 5. Родамин Б был иммобилизован на оставшиеся свободные аминокислоты в боковых цепях белка карбоксильными группами.

Количество связанного с белком ИЦЗ определяли спектрофотометрически на длине волны 700 нм. Сравнение спектров поглощения чистого ИЦЗ с концентрацией 40 мкг/мл и образца А-200-тозил-rhVEGF-A121-ИЦЗ показаны на рисунке 6. Отчетливо видно, что в инфракрасной области спектра наблюдаются лишь полосы поглощения ИЦЗ, в то время как полосы поглощения Аэросила и белка лежат в ультрафиолетовой области

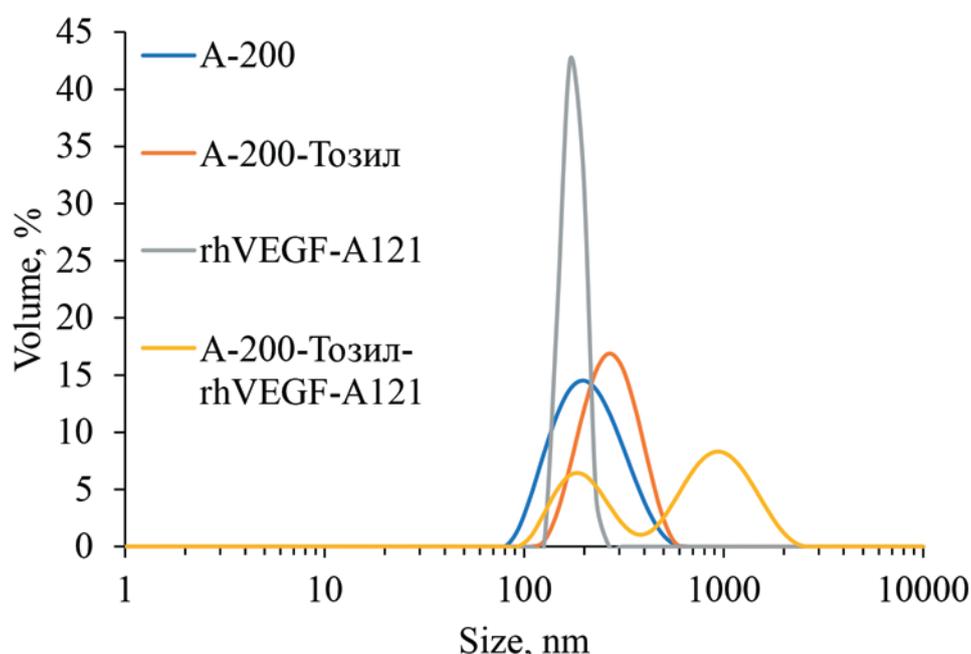


Рис. 3. Результаты исследования размеров нанообъектов методом DLS

Figure 3. Results of studying the sizes of nanoobjects using the DLS method

спектра, что облегчает определение количества флуорофора.

Содержание ИЦЗ в образце rhVEGF-A121-ИЦЗ составило 2,0 мг или 2,6 мкмоль на 1 грамм носителя, что вполне применимо для исследований на флуоресцентном томографе.

Также на рисунке 5 показано, что наиболее интенсивно с образцом А-200-тозил-rhVEGF-A121 связывается флуоресцентный краситель Родамин Б, поскольку его полоса поглощения 555 нм имеет наибольшую интенсивность в образце А-200-тозил-rhVEGF-A121-ИЦЗ-Родамин Б. Замечено, что Родамин Б постепенно гидролизуются и переходят в раствор, ввиду чего такие образцы долго не хранятся, что воспрепятствовало определению точной концентрации этого флуорофора в полученном нанобъекте.

### Обсуждение

Оптимизация активных систем для адресной доставки инкапсулированных лекарств является нерешенной задачей. Один из путей повышения эффективности носителей лекарственных средств — использование их специфических взаимодействий с мембранными рецепторами [23]. Выбор факторов роста (или их коротких белковых мотивов) в качестве векторов для нацеливания тераностического агента в патологический очаг

очень привлекателен с точки зрения повышения такой эффективности, а также снижения системного воздействия на организм лекарственных средств и уменьшения нежелательных явлений, что значительно расширяет возможности терапии многих заболеваний. Кроме того, целенаправленная доставка лекарства внутрь клетки-мишени позволяет снизить эффективную дозу, повышая тем самым доступность многих дорогостоящих лекарственных препаратов. Решающим фактором в выборе пары лиганд/рецептор служит повышенный уровень экспрессии рецепторов в интересующих патологических тканях по сравнению с нормальной тканью, что для генов семейства VEGFR было показано, например, в исследовании профилей экспрессии рака почки [24]. Достаточная изученность функции рецепторов и кристаллической структуры аффинно-связанных пар лиганд/рецептор делает их пригодными для молекулярного моделирования, описывающего массивные конформационные и структурные изменения, происходящие в момент образования пары. Например, перспективными кандидатами для разработки систем лиганд/рецептор-опосредованной доставки можно считать пары VEGF/VEGFR [25], EGF/EGFR [26, 27] и FGF/FGFR [28, 29].

На рынке уже имеется десяток систем, в основном на основе наноносителей (липосом, полимер-

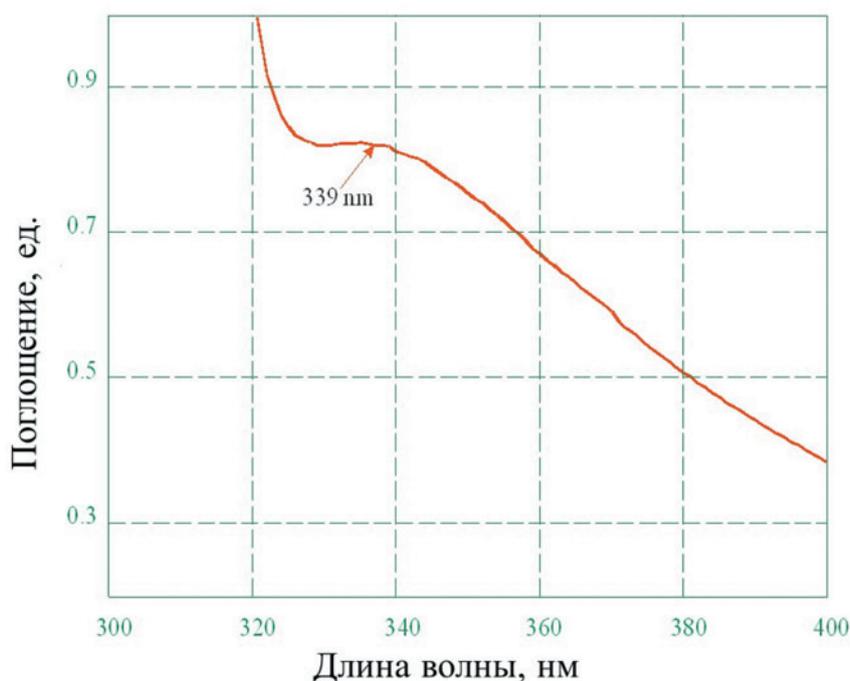


Рис. 4. Спектр поглощения образца А-200-тозил-rhVEGF-A121

Figure 4. Absorption spectrum of sample A-200-tosyl-rhVEGF-A121

Таблица 1. Концентрация белка в образцах

Образец	Концентрация белка, мкг/мл
Белок чистый	2,000
Смыв 1	0,241
Смыв 2	0,332
Смыв 3	0,532
Смыв 4	0,221
Смыв 5	0,280
Связанный белок	0,503
Всего смывов и связанного белка	2,109

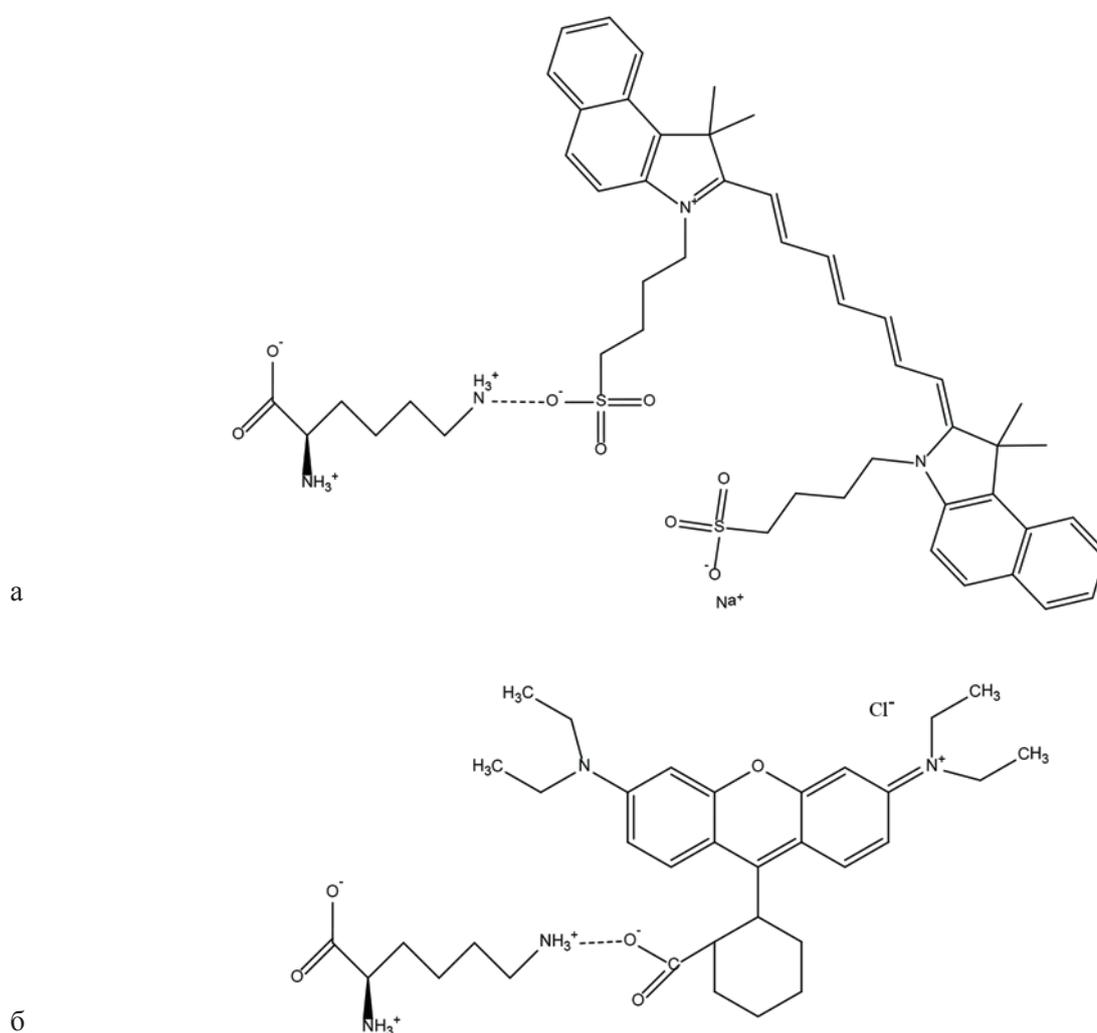


Рис. 5. Возможные пути хемосорбции флуорофоров: а — координационно-ионная иммобилизация индоцианина зеленого на аминогруппу лизина; б — структурная формула Родамина Б, поясняющая центры иммобилизации

Figure 5. Possible pathways for chemisorption of fluorophores: a — coordination-ionic immobilization of indocyanine green on the amino group of lysine; b — structural formula of rhodamine B, explaining the immobilization centers

ных мицелл и др.), которые могут транспортировать тераностический агент к очагу заболевания за счет взаимодействия между конъюгированными лигандами и поверхностными рецепторами, в большом количестве представленными на мембране клеток-мишеней. Системы активного таргетинга могут быть также основаны на конъюгатах, причем под этим понимается прямая конъюгация лиганда и молекулы лекарственного средства с линкером или без него, хорошо освещенная в литературе [30].

Связывание направляющего лиганда с наночастицами придает тераностическому комплексу новые свойства, позволяющие повысить степень его задержки в целевой области, а также улучшить показатели фармакокинетики и фармакодинамики потенциального лекарственного средства. При этом прочная ковалентная связь лиганда с наночастицей лекарственного средства позволит избежать нежелательной диссоциации направляющей молекулы и средства доставки. Определенные сомнения может вызывать способность иммобилизованного лиганда к взаимодействию с целевым рецептором. Полагаем, что тщательный подбор связывающего линкера определенной длины

и пространственной гибкости позволит разрешить сомнения в пользу предложенного разработчиками продукта. Также негативное влияние на эффективность лиганда может оказывать гетерогенность его сайт-специфической конъюгации с НЧ или лекарственным веществом. Для повышения гомогенности типов связей можно использовать включение неканонических аминокислот с ортогонально-реактивной функциональной группой, такой как альдегидная, кетонная, азидо- или алкинильная. Такой подход позволит использовать новые биоортогональные химические реакции, в которых используются реактивные фрагменты, отличные от тиола или амина. Это расширяет разнообразие линкеров, которые можно использовать, что приведет к повышению характеристик будущих систем доставки [31]. Также для улучшения их дизайна можно применить методы молекулярно-динамического моделирования, которые позволят напрямую визуализировать биологические реакции узнавания и связывания между участниками процесса активного нацеливания [32].

Включенный в состав препарата направляющий лиганд, являясь по сути сигнальной молекулой, может быть также использован в виде активного

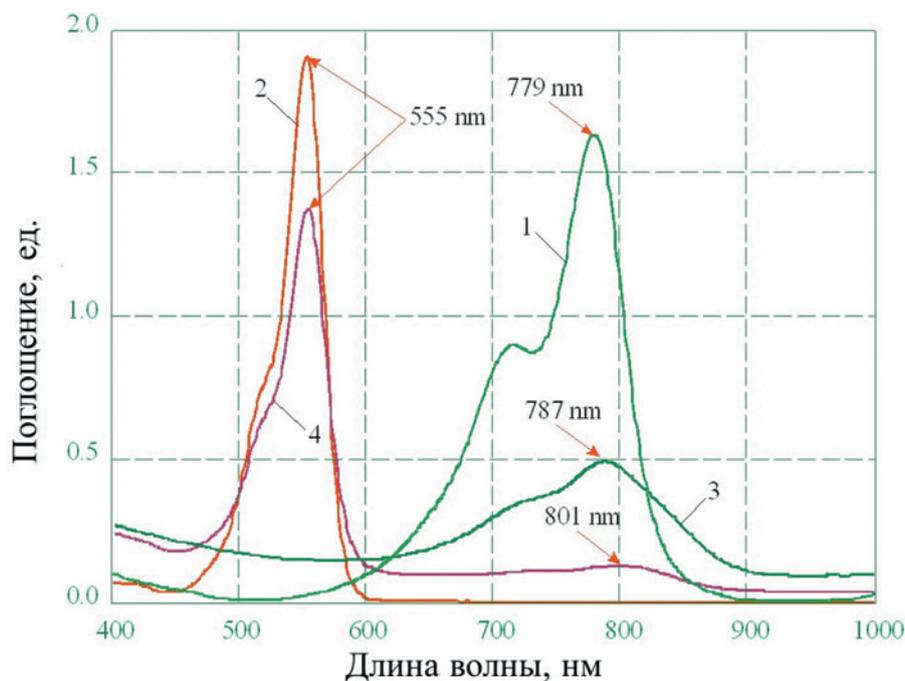


Рис. 6. Спектры поглощения: 1 — ИЦЗ с концентрацией 40 мкг/мл; 2 — Родамин Б с концентрацией 10 мкг/мл; 3 — образец А-200-тозил-rhVEGF-A121-ИЦЗ; 4 — образец А-200-тозил-rhVEGF-A121-ИЦЗ-Родамин Б

Figure 6. Absorption spectra: 1 — ICG with a concentration of 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; 2 — Rhodamine B with a concentration of 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; 3 — sample A-200-tosyl-rhVEGF-A121-ICZ; 4 — sample A-200-tosyl-rhVEGF-A121-ICZ-Rhodamine B

или доминант-негативного миметика эндогенного сосудистого фактора роста, как, впрочем, и в качестве блокатора его рецептора. Дополняя воздействие на патологическую ткань доставляемого диагностического вещества или потенцируя эффект включенного в состав комплекса лекарственного агента, экзогенный лиганд VEGF придает системе дополнительные тераностические качества, полезные как для онкологии, так и для кардиологии. При этом необходимо обратить особое внимание на два аспекта, требующие дальнейшей интеллектуальной и экспериментальной проработки.

Первый заключается в возникновении возможной конкуренции с эндогенным VEGF, чья экспрессия может повышаться в процессе роста опухолевой ткани в связи с необходимостью поддержания митогенного сигнала в трансформированных клетках и стимуляции процесса неоангиогенеза. Однако в этом случае эндогенный VEGF является локальным участником и его воздействие может расцениваться в качестве паракринного. При системном введении экзогенный лиганд-содержащий препарат, скорее всего, получит явное количественное преобладание, что обеспечит ему конкурентное преимущество, в том числе и из-за реципрокного снижения эндогенной экспрессии на фоне возросшей конкуренции за рецептор.

Второй аспект связан с тем, что некоторые этапы механизмов стимуляции так называемого биологического шунтирования и опухолевого неоангиогенеза, связанные с эффектом VEGF, совпадают. Поэтому нельзя исключить, что в случае использования полученной в ходе нашей работы конструкции для доставки препарата в ишемизированную ткань сердца у пациентов с сопутствующим онкологическим заболеванием, биологически активный rhVEGF может также вызывать нежелательную стимуляцию эпителия кровеносных сосудов опухоли. В этом случае для нейтрализации его собственной биологической функции интересным видится ряд генно-инженерных модификаций rhVEGF, которые позволят придать этому белку или его пептидному мотиву способность блокировать передачу сигнала внутрь клетки через VEGFR (выключение митогенного потенциала экзогенного рекомбинантного лиганда), а также увеличат его сродство с рецептором (настройка 3-мерной конфигурации) для повышения конкурентоспособности против эндогенно-экспрессирующегося нативного VEGF. Последнее качество — повышение сродства к рецептору — также полезно и в случае с ишемизированной тканью, хотя в этой ситуации потребуются изменения противоположного характера,

а именно усиливающие активность лиганда как ростового фактора.

Оба перечисленных выше аспекта могут быть оценены только после серии дополнительных экспериментов на моделях *in vitro* и *in vivo*. Наиболее актуальным является поиск решения задачи разделения эффектов рекомбинантного лиганда в системе, где одновременно требуется стимуляция терапевтического ангиогенеза и подавление неоангиогенеза. Результаты дополнительных исследований покажут путь, по которому следует двигаться для достижения основной цели — создания эффективного тераностического агента, поддающегося настройке и пригодного для использования в различных разделах медицины и, в первую очередь, в кардиологии и онкологии.

### Заключение

В ходе выполнения работы нами был решен ряд исследовательских задач, а именно:

1. Проведена функционализация НЧК тозилным спейсером;
2. Синтезированы конъюгаты НЧК с rhVEGF-A121;
3. Получены тераностические конструкции на основе НЧК, включающие rhVEGF-A121 в качестве направляющего лиганда (и одновременно действующего вещества при ишемии) и ИЦЗ/Родамин Б в качестве визуализирующей метки.

Модификация препарата сразу двумя флуоресцентными красителями позволяет наиболее надежно проследить путь его распространения *in vivo* и приближает нас к созданию контролируемых систем тераностики.

Апробация созданного тераностического агента в дальнейшем будет проведена на моделях *in vitro* и *in vivo*. Результаты планируемого эксперимента, в случае успеха, могут стать еще одним шагом к созданию платформенного решения для диагностики препаратов с иными ростовыми факторами в качестве направляющего лиганда, основанного на использовании схожих принципов активной лиганд-опосредованной доставки. Мы надеемся, что получение подобного мощного инструмента специфического и избирательного воздействия на патологическую ткань сможет найти свое применение в научных исследованиях и доклинических испытаниях, а позднее — и в терапии широкого круга патологий.

### Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциально конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

**Финансирование / Funding**

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 23-15-00151). / This study was supported by the Russian Science Foundation (Project 23-15-00151).

**Список литературы / References**

- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 2003;9:669–676. DOI: 10.1038/nm0603-669.
- Nagy JA, Dvorak AM, Dvorak HF. VEGF-A and the induction of pathological angiogenesis. *Annu Rev Pathol.* 2007;2:251–75. DOI: 10.1146/annurev.pathol.2.010506.134925.
- Peach CJ, Mignone VW, Arruda MA, et al. Molecular Pharmacology of VEGF-A Isoforms: Binding and Signalling at VEGFR2. *Int J Mol Sci.* 2018; 19(4):1264. DOI: 10.3390/ijms19041264.
- Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, et al. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science.* 1983;219(4587):983–5. DOI: 10.1126/science.6823562.
- Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, et al., Vascular Endothelial Growth Factor Is a Secreted Angiogenic Mitogen. *Science.* 1989;246:1306–1309. DOI: 10.1126/science.2479986.
- Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989;161(2):851–8. DOI: 10.1016/0006-291x(89)92678-8.
- Claesson-Welsh L, Welsh M. VEGFA and tumour angiogenesis. *J Intern Med.* 2013;273(2):114–27. DOI: 10.1111/joim.12019.
- Houck KA, Ferrara N, Winer J, et al. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol.* 1991;5(12):1806–14. DOI: 10.1210/mend-5-12-1806.
- Tischer E, Mitchell R, Hartman T, et al. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem.* 1991;266(18):11947–54.
- Sa-Nguanraksa D, O-Charoenrat P. The role of vascular endothelial growth factor polymorphisms in breast cancer. *Int J Mol Sci.* 2012;13(11):14845–64. DOI: 10.3390/ijms131114845.
- Ferrara N, Adamis AP. Ten years of anti-vascular endothelial growth factor therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2016;15(6):385–403. DOI: 10.1038/nrd.2015.17.
- Ferrara N, Hillan KJ, Novotny W. Bevacizumab (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 333(2):328–35. DOI: 10.1016/j.bbrc.2005.05.132.
- Mamer SB, Wittenkeller A, Imoukhuede PI. VEGF-A splice variants bind VEGFRs with differential affinities. *Sci Rep.* 2020;10(1):14413. DOI: 10.1038/s41598-020-71484-y.
- Huang Y, Li P, Zhao R, et al. Silica nanoparticles: Biomedical applications and toxicity. *Biomed Pharmacother.* 2022 Jul;151:113053. DOI: 10.1016/j.biopha.2022.113053. Epub 2022 May 17. PMID: 35594717.
- Kirla H, Henry DJ, Jansen S, et al. Use of Silica Nanoparticles for Drug Delivery in Cardiovascular Disease. *Clin Ther.* 2023 Nov;45(11):1060–1068. DOI: 10.1016/j.clinthera.2023.08.017. Epub 2023 Oct 1. PMID: 37783646.
- Galagudza M, Korolev D, Postnov V, et al. Passive targeting of ischemic-reperfused myocardium with adenosine-loaded silica nanoparticles. *Int J of Nanomed.* 2012; 7:1–8.
- Galagudza MM, Korolev DV, Syrensky AV, et al. Method of cardioprotection. Patent RU 2456024, 26.04.2010. In Russian [Галагудза М.М., Королев Д.В., Сыренский А.В. и др. Способ кардиопротекции. Патент на изобретение RU 2456024 от 26.04.2010 г.].
- Galagudza MM, Korolev DV, Sonin DL, et al. Targeted drug delivery — results of recent years and prospects. *Nanotechnology Ecology Production.* 2010;1:132–138. In Russian [Галагудза М.М., Королев Д.В., Сонин Д.Л. и др. Направленная доставка лекарственных препаратов — итоги последних лет и перспективы. Нанотехнологии. Экология. Производство. 2010;1:132–138].
- Galagudza MM, Korolev DV, Sonin DL, et al. Passive targeted drug delivery to the ischemic myocardium using silica nanoparticles. *Russian nanotechnologies.* 2010;5:(11–12):92–97. In Russian [Галагудза М.М., Королев Д.В., Сонин Д.Л. и др. Пассивная направленная доставка лекарственных препаратов в ишемизированный миокард с использованием наночастиц кремнезема. Российские нанотехнологии. 2010;5:(11–12):92–97].
- Smirnova N. The effectiveness of enterosorbent “Polysorb MP” in patients with infectious diseases. *Doctor.* 2007;3:80–82. In Russian [Смирнова Н. Эффективность энтеросорбента «Полисорб МП» у больных инфекционными заболеваниями. *Врач.* 2007;3:80–82].
- Ratnikova L, Permitina M, Popilov A. Polysorb in toxic hepatitis. *Doctor.* 2007;2:64–66. In Russian [Ратникова Л., Пермитина М., Попилов А. Полисорб при токсическом гепатите. *Врач.* 2007;2:64–66].
- Lisichkin GV. Chemistry of grafted surface compounds. M.: FIZMATLIT, 2003. P. 592. In Russian [Лисичкин Г.В. Химия привитых поверхностных соединений. М.: ФИЗМАТЛИТ, 2003. С. 592].
- Mehra NK, Mishra V, Jain NK. Receptor-based targeting of therapeutics. *Ther Deliv.* 2013;4(3):369–94. DOI: 10.4155/tde.13.6.
- Cheburkin YuV, Knyazeva TG, Peter S, et al. Molecular Portrait of Human Kidney Carcinomas: The

cDNA Microarray Profiling of Kinases and Phosphatases Involved in the Cell Signaling Control. *Molecular Biology*. 2002;36(3):376–384. In Russian [Чебуркин Ю.В., Князева Т.Г., Петер Ш. и др. Молекулярный портрет карцином почки человека, полученный на основе экспрессии протеин-тирозин-киназ и тирозин-фосфатаз, контролирующих передачу регуляторных сигналов в клетках. *Молекулярная биология*. 2002;36(3):480–490]. DOI: 10.1023/A:1016059313254.

25. Michigami M, Takahashi K, Yamashita H, et al. A “ligand-targeting” peptide-drug conjugate: Targeted intracellular drug delivery by VEGF-binding helix-loop-helix peptides via receptor-mediated endocytosis. *PLoS One*. 2021;16(2):e0247045. DOI: 10.1371/journal.pone.0247045.5.

26. Master AM, Sen Gupta A. EGF receptor-targeted nanocarriers for enhanced cancer treatment. *Nanomedicine (Lond)*. 2012;7(12):1895–906. DOI: 10.2217/nnm.12.160.

27. Habban Akhter M, Sateesh Madhav N, Ahmad J. Epidermal growth factor receptor based active targeting: a paradigm shift towards advance tumor therapy. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2018;46(sup2):1188–1198. DOI: 10.1080/21691401.2018.1481863.

28. Terada T, Mizobata M, Kawakami S, et al. Basic fibroblast growth factor-binding peptide as a novel targeting ligand of drug carrier to tumor cells. *J Drug Target*. 2006;14(8):536–545. DOI: 10.1080/10611860600849498.

29. Wu Y, Lu C-T, Li W-F, et al. Preparation and antitumor activity of bFGF-mediated active targeting doxorubicin microbubbles. *Drug Dev Ind Pharm*. 2013;39(11):1712–1719. DOI: 10.3109/03639045.2012.730527.

30. Wang X, Li S, Shi Y, et al. The development of site-specific drug delivery nanocarriers based on receptor mediation. *J Control Release*. 2014;193:139–153. DOI: 10.1016/j.jconrel.2014.05.028.

31. Jain N, Smith SW, Ghone S, et al. Current ADC Linker Chemistry. *Pharm Res*. 2015;32(11):3526–40. DOI: 10.1007/s11095-015-1657-7.

32. Gocheva G, Ivanova A. A Look at Receptor–Ligand Pairs for Active-Targeting Drug Delivery from Crystallographic and Molecular Dynamics Perspectives. *Mol Pharm*. 2019;16(8):3293–3321. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.9b00250.

33. Knyazev YuP, Cheburkin YuV, Spikermann K, et al. The cDNA Microarray Profiling of Protein Kinases and Phosphatases: Molecular Portrait of Human Prostate Carcinomas. *Molecular Biology*. 2003;37(1):89–101. In Russian [Князев Ю.П., Чебуркин Ю.В., Спикерманн К. и др. Профили экспрессии протеинкиназ и фосфатаз, полученные с помощью упорядоченных наборов кДНК (cDNA Arrays): молекулярный портрет рака предстательной железы. *Молекулярная биология*. 2003;37(1): 97–111]. DOI: 10.1023/A:1022341015018.

#### Информация об авторах:

Чебуркин Юрий Владимирович, к.м.н., заведующий НИЛ инфекционных патогенов и биомолекулярных наноструктур, научный сотрудник НИЛ нейрогенеза и нейродегенеративных заболеваний НЦМУ «Центр персонализированной медицины», ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Шульмейстер Галина Анатольевна, младший научный сотрудник НИЛ нанотехнологий, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Бондаренко Андрей Борисович, младший научный сотрудник НИЛ инфекционных патогенов и биомолекулярных наноструктур, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России; старший преподаватель кафедры медицинской биологии ФГБОУ ВО «СПбГПМУ» Минздрава России;

Чистякова Анастасия Вячеславовна, студент СПбГЭТУ «ЛЭТИ»;

Королев Дмитрий Владимирович, д.х.н., заведующий НИЛ нанотехнологий, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России; научный сотрудник ФГБОУ ВО «ПСПбГМУ им. И. П. Павлова» Минздрава России.

#### Authors information:

Yuri V. Cheburkin, MD, PhD, head of Research Laboratory of Infectious Pathogens and Biomolecular Nanostructures, research scientist, Research Laboratory of Neurogenesis and Neurodegenerative Diseases, World-Class Research Centre for Personalized Medicine, Almazov National Medical Research Centre;

Galina A. Shulmeister, junior research assistant of the Research Laboratory of Nanotechnologies, Almazov National Medical Research Centre;

Andrey B. Bondarenko, junior research scientist, Research Laboratory of Infectious Pathogens and Biomolecular Nanostructures, Almazov National Medical Research Centre; senior lecturer of Department of Medical Biology, Saint Petersburg State Pediatric Medical University;

Anastasia V. Chistyakova, student of Saint Petersburg Electrotechnical University “LETI”;

Dmitry V. Korolev, PhD, head of the Research Laboratory of Nanotechnologies, Almazov National Medical Research Centre; research scientist of Academician I. P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University.

## МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ И БИОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОСТЕОГЕНЕЗА ПРИ МЕДИКАМЕНТОЗНОЙ ТЕРАПИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОСТЕОПОРОЗА

Лисовский Д. А.<sup>1</sup>, Мамина Н. Ш.<sup>1</sup>, Дробленков А. В.<sup>1</sup>,  
Байрамов А. А.<sup>1,2</sup>, Бобков П. С.<sup>1</sup>, Фёдоров Н. А.<sup>2</sup>,  
Каронова Т. Л.<sup>2</sup>, Шабанов П. Д.<sup>1</sup>

### Контактная информация:

Лисовский Дмитрий Александрович,  
ФГБНУ «ИЭМ»,  
ул. Академика Павлова, д. 12,  
Санкт-Петербург, Россия, 197022.  
E-mail: lisovskiy\_d\_med@mail.ru

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Национальный медицинский исследовательский центр имени  
В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской  
Федерации, Санкт-Петербург

Статья поступила в редакцию  
18.10.2023 и принята к печати 23.11.2023.

### Резюме

**Актуальность.** Остеопороз представляет собой клинико-экономическую проблему мирового масштаба. Существенным вкладом в решение проблемы эффективного лечения остеопороза может стать создание препаратов на основе уникальных биологически активных соединений. **Целью** исследования явилось морфологическое обоснование экспериментальной модели остеопороза и комплексная (многофакторная) оценка эффективности его медикаментозной терапии. **Материалы и методы.** Исследование выполнено на 40 половозрелых самках крыс Вистар, которые составили 6 групп. У животных четырех опытных групп (по 6 особей в каждой) формировали модель остеопороза: первую и вторую группу (соответственно) составили крысы молодого возраста, третью и четвертую — старого. Животным второй и четвертой групп вводили препарат, апробируемый на способность активировать процесс остеосинтеза. Крысы пятой и шестой групп (молодые и старые, по 8 особей в каждой), подвергнутые ложной операции, служили контролями. В результате применения гистоморфометрического метода и атомно-абсорбционной спектроскопии в диафизах бедренных костей устанавливали толщину слоев компактного вещества, число костных пластинок и остеоцитов, а также количество коллагена, кальция и фосфора. При помощи иммуноферментного анализа в сыворотке крови устанавливали маркеры костного ремоделирования — остеокальцина, склеростина, остеопротегерина, фактора роста фибробластов-23 и лиганда активатора ядерного фактора каппа-β (RANKL). Статистическую обработку данных проводили с использованием программы GraphPad PRISM (USA) определения медианы, верхнего и нижнего квартилей. Различия считали значимыми при  $p < 0,01$ . **Результаты.** Моделирование остеопороза индуцирует атрофическое истончение компактного вещества, снижение числа остеоцитов и костных пластинок в диафизах бедренных костей, уменьшение в них содержания коллагена, кальция и фосфора, снижение концентрации остеокальцина, склеростина, фактора роста фибробластов, остеопротегерина и увеличение концентрации RANKL в плазме крови, более выраженные у старых животных. В результате использования препарата ХЗ для терапии остеопороза выявлены: значительное увеличение толщины компактного вещества, количества остеоцитов и костных пластинок в диафизах, содержания в них коллагена, кальция и фосфора, увеличение концентрации биохимических маркеров остеосинтеза, слабо выраженный дисбаланс RANKL. Увеличение содержания в плазме маркеров кост-

ного ремоделирования было наиболее выраженным при комбинации препарата ХЗ с витамином ДЗ.

**Заключение.** 1. Использованный эндокринно-хирургический способ моделирования остеопороза приводит к выраженным дегенеративным изменениям остеоцитов и их производных во всех отделах компактного вещества кости, а также вызывает значительные нарушения минерального состава и дисбаланс маркеров костного ремоделирования, более выраженные у сенильных крыс. 2. Тестируемый препарат ХЗ, использованный для терапии остеопороза, обладает высокой степенью эффективности, поскольку стимулирует регенераторный остеогенез, восстанавливает нарушенное строение элементов костной ткани, ее органических и минеральных компонентов. 3. Восстановительный эффект препарата более выражен у сенильных крыс.

**Ключевые слова:** антиостеопорозное средство, коллаген, костное ремоделирование, костные пластинки, маркеры остеогенеза, остеопороз, остеоциты.

*Для цитирования:* Лисовский Д.А., Мамина Н.Ш., Дробленков А.В. и др. Морфологическая и биохимическая характеристика остеогенеза при медикаментозной терапии экспериментального остеопороза. *Трансляционная медицина.* 2023;10(6):535-548. DOI: 10.18705/2311-4495-2023-10-6-535-548. EDN: LOUQMK

## MORPHOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF OSTEOGENESIS DURING DRUG THERAPY OF EXPERIMENTAL OSTEOPOROSIS

Dmitriy A. Lisovsky<sup>1</sup>, Nailya Sh. Mamina<sup>1</sup>, Andrey V. Drobленkov<sup>1</sup>, Alekber A. Bairamov<sup>1,2</sup>, Pavel S. Bobkov<sup>1</sup>, Nikita A. Fedorov<sup>1</sup>, Tatiana L. Karonova<sup>2</sup>, Petr D. Shabanov<sup>1</sup>

**Corresponding author:**  
Dmitriy A. Lisovsky,  
Institute of Experimental Medicine,  
Akademika Pavlova str., 12,  
Saint Petersburg, Russia, 197022.  
E-mail: lisovskiy\_d\_med@mail.ru

<sup>1</sup> Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia

<sup>2</sup> Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

Received 18 October 2023; accepted 23 November 2023.

### Abstract

**Relevance.** Osteoporosis is a clinical and economic problem on a global scale. A significant contribution to solving the problem of effective treatment of osteoporosis can be the creation of drugs based on unique biologically active compounds. The **aim** of the study was the morphological substantiation of the experimental model of osteoporosis and a comprehensive (multifactorial) assessment of the effectiveness of its drug therapy. **Materials and methods.** The study was carried out on 40 mature female Wistar rats, which comprised 6 groups. A model of osteoporosis was formed in animals of four experimental groups (6 animals in each): the first and second groups (respectively) consisted of young rats, the third and fourth — old ones. Animals of the second and fourth groups were injected with a drug tested for its ability to activate the process of osteosynthesis. Rats of the fifth and sixth groups (young and old, 8 animals each), subjected to sham surgery, served as controls. As a result of the use of the histo-morphometric method and atomic absorption spectroscopy in the diaphysis of the femur, the thickness of the layers of the compact substance, the number of bone plates and osteocytes, as well as the amount of collagen, calcium and phosphorus were determined. Using enzyme immunoassay, bone remodeling markers — osteocalcin, sclerostin, osteoprotegerin, fibroblast growth factor-23 and nuclear factor kappa- $\beta$  activator ligand (RANKL) — were determined in the blood serum. Statistical processing of the data was carried out using the GraphPad PRISM (USA) program to determine the median, upper and lower quartiles.

Differences were considered significant at  $p < 0.01$ . **Results.** Modeling of osteoporosis induces atrophic thinning of the compact substance, a decrease in the number of osteocytes and bone plates in the diaphysis of the femur, a decrease in the content of collagen, calcium and phosphorus in them, a decrease in the concentration of osteocalcin, sclerostin, fibroblast growth factor, osteoprotegerin and an increase in the concentration of RANKL in the blood plasma, more pronounced in old animals. As a result of the use of the drug X3 for the treatment of osteoporosis, the following were revealed: a significant increase in the thickness of the compact substance, the number of osteocytes and bone plates in the diaphysis, the content of collagen, calcium and phosphorus in them, an increase in the concentration of biochemical markers of osteosynthesis, and a mild imbalance of RANKL. The increase in plasma levels of markers of bone remodeling was most pronounced when the drug X3 was combined with vitamin D3. **Conclusion.** 1. The used surgical-endocrine method of modeling osteoporosis leads to pronounced degenerative changes in osteocytes and their derivatives in all parts of the compact bone substance, and also causes significant disturbances in the mineral composition and an imbalance of bone remodeling markers, more pronounced in senile rats. 2. The tested drug X3, used for the treatment of osteoporosis, has a high degree of effectiveness, since it stimulates regenerative osteogenesis, restores the damaged structure of bone tissue elements, its organic and mineral components. 3. The restorative effect of the drug is more pronounced in senile rats.

**Key words:** anti-osteoporotic agent, bone plates, bone remodeling, collagen, osteocytes, osteogenesis markers, osteoporosis.

*For citation: Lisovsky DA, Mamina NS, Droblenkov AV, et al. Morphological and biochemical characteristics of osteogenesis during drug therapy of experimental osteoporosis. Translyatsionnaya meditsina=Translational Medicine. 2023;10(6):535-548 (In Russ.) DOI: 10.18705/2311-4495-2023-10-6-535-548. EDN: LOUQMK*

**Список сокращений:** ВОЗ — Всемирная организация здравоохранения, ИФА — иммуноферментный анализ, ОК — остеокальцин, ОП — остеопороз, FGF23 — фактор роста фибробластов-23, IOF — International Osteoporosis Foundation, OPG — остеопротегерин, RANKL — лиганд активатора ядерного фактора каппа- $\beta$ , Skl — склеростин.

### Введение

Остеопороз (ОП) представляет собой проблему во всем мире с важными клиническими и экономическими последствиями [1, 2]. Действительно, переломы, связанные с остеопорозом, являются причиной значительного роста заболеваемости, инвалидности и смертности, особенно у пожилых людей, что существенно увеличивает расходы на здравоохранение [1–3].

По данным ВОЗ, ОП сегодня — одно из наиболее распространенных заболеваний, которое наряду с инфарктом миокарда, инсультом, раком и внезапной смертью занимает ведущее место в структуре заболеваемости и смертности населения. ОП и вызываемые им переломы являются основной причиной болезни, нетрудоспособности и смерти и составляют огромную статью расходов в здравоохранении [4–6]. Женщины в постме-

нопаузальный период наиболее уязвимы и чаще подвержены остеопорозу по сравнению с мужчинами — 80 % из всех пациентов с ОП составляют женщины [4, 5].

ОП — это системное метаболическое заболевание скелета, характеризующееся снижением массы костей и нарушениями микроархитектоники костной ткани, которое приводит к значительному увеличению хрупкости костей и возможности их переломов [7]. По данным International Osteoporosis Foundation (IOF) [8], ОП страдают около 75 млн человек в Европе, США и Японии [8, 9]. По прогнозам IOF, к 2050 году в связи с увеличением продолжительности жизни во всем мире, число случаев перелома костей тазобедренного сустава вследствие ОП увеличится на 240 % у женщин и на 310 % — у мужчин. Инвалидность вследствие ОП в странах Европы по частоте превышает таковую от рака (за исключением рака легких) и сравнима с инвалидностью от хронических неинфекционных заболеваний (ревматоидный артрит, астма и артериальная гипертензия) [6, 10, 11].

Согласно исследованиям НИИ ревматологии РАМН, в России ОП имеют 33,8 % женщин и 26,9 % мужчин старше 50 лет, у 43,3 % женщин и 44,1 % мужчин определяются признаки остеопении [12, 13]. Таким образом, ОП в России страдают

14 млн человек (10 % населения страны), у 20 млн состояние МПК соответствует остеопении, и 34 млн жителей страны имеют реальный риск остеопоротических переломов. Ожидается, что в связи с постарением населения число больных ОП в России вырастет на 1/3 к 2050 году [12]. Оценка общей тенденции в мире показала, что только за счет старения популяции земного шара частота переломов, например шейки бедра, в период с 2005 по 2050 гг. должна увеличиться в два раза [3].

В последние десятилетия проблема ОП приобрела особое значение в результате увеличения в популяции людей пожилого и старческого возраста и, в частности, количества женщин в постменопаузальном периоде. Около одной трети общей продолжительности жизни женщин приходится на период постменопаузы, что увеличивает вероятность развития как постменопаузального, так и сенильного остеопороза [14, 15]. В связи с ростом числа пожилых людей, это заболевание становится медико-социальной проблемой.

Недостаточную эффективность предложенных программ профилактики и лечения остеопороза можно объяснить более сложными механизмами его развития, чем простой дефицит кальция. Поэтому необходимо использовать для лечения и профилактики ОП такие методы, препараты, которые отвечают биологии возрастного развития и патофизиологии развития ОП. Существенным вкладом в решение проблемы распространения остеопороза может стать создание препаратов на основе уникальных биологически активных соединений.

Новым подходом в профилактике и лечении сенильного и постменопаузального остеопороза и дефицита витамина  $D_3$ , в частности, является применение в лекарственной терапии комплекса кислых солей янтарной кислоты, потенциально влияющего на усвоение макро- и микроэлементов костной тканью, на биотрансформацию витамина  $D_3$  и повышающего биодоступность его активных форм в организме [12, 16–19]. Из природных субстратов-метаболитов кислые соли сукцината являются наиболее сильными модуляторами орфаных рецепторов, кальциевых каналов L-типа, активируют аккумуляции  $Ca^{2+}$  внутри клетки эндоплазматическим и саркоплазматическим ретикуломом и митохондриями, активируют лимитирующий этап в метаболизме холестерина — вход в митохондрий и последующую биотрансформацию в активные формы стероидов [16, 18, 20, 21]. В экспериментальном исследовании сукцинат-содержащий комплексный препарат повышал индекс массы костной ткани, увеличивал синтез эстрогенов и андрогенов в условиях гормональ-

ного дефицита [17, 19, 22]. Ожидаемый результат от внедрения технологии — эффективная терапия в профилактике и лечении ОП, дефицита витамина  $D_3$  и, соответственно, снижение количества опорно-двигательных, эндокринных и кардиоваскулярных заболеваний, уменьшение риска инвалидизации и преждевременной смерти [16, 17, 23–25].

Вместе с тем в литературе отсутствует системное представление о дегенеративных изменениях элементов костной ткани при моделировании остеопороза и степени обратимости этих изменений при заместительной терапии.

Таким образом, целью данной работы являлось морфологическое обоснование экспериментальной модели остеопороза и комплексная (многофакторная) оценка эффективности его медикаментозной терапии у самок крыс разного возраста в хроническом опыте продолжительностью 30 дней.

#### Материалы и методы

Исследование выполнено на 40 половозрелых самках крыс Вистар, которые составили 6 групп. У животных четырех опытных групп (по 6 особей в каждой) согласно «Правилам лабораторной практики в Российской Федерации» (приказ МЗ РФ от 2003 г. № 267) формировали модель остеопороза. Первую и вторую группы (соответственно) составили крысы 4-6-месячного (молодого) возраста массой 240–260 г, третью и четвертую — 12-14-месячного (сенильного) возраста массой 360–420 г. Животным второй и четвертой групп после экспериментального формирования остеопороза вводили препарат, апробируемый на способность активировать процесс остеосинтеза. Крысы пятой и шестой групп (молодые и старые, по 8 особей в каждой), подвергнутые ложной операции, служили контролями.

Метод создания экспериментальной модели остеопороза, использованный в настоящем исследовании, описан в ряде работ [1, 12, 26, 27]. Суть метода заключается в двустороннем хирургическом удалении яичников у самок крыс, с последующим двукратным введением преднизолона. Двусторонняя овариоэктомия проведена в соответствии с рекомендациями, изложенными в руководстве Бунока (1968 г.). Животных наркотизировали эфиром и фиксировали на операционном столе в положении на животе. Шерсть на спине от тазовой области до реберной дуги выстригали, кожу обрабатывали спиртом и разбавленным спиртовым раствором йода. Скальпелем делали продольный разрез длиной 1,5–2 см по средней линии спины. Передвигая разрез, поочередно,

налево и направо, делали прокол в задней части брюшной полости. Правый или левый рог матки выводили через прокол наружу, затем находили яичник и электрокаутером отсекали его от рога матки. Аналогичным образом удаляли и второй яичник. Проколы брюшины и надрез спины обрабатывали стрептоцидом. Ушивали спинной разрез и шов обрабатывали 5 % йодной настойкой. После операции животных помещали в чистую клетку, в течение первых 4–5 дней проводили ежедневную обработку раны дезинфицирующими средствами. Заживление раны происходило на 7–9 день. Через 3 недели после операции самкам крыс внутрибрюшинно вводили раствор преднизолона в дозе 25 мг/кг. Второе введение преднизолона аналогичным способом и в аналогичной дозировке осуществляли через 15 дней. Для оценки выраженности остеопороза использовали методику прижизненной валидации этой патологии по определению маркеров костного ремоделирования в крови [28].

По окончании эксперимента у молодых декапитированных животных были извлечены и исследованы правые и левые бедренные кости при помощи гистоморфологических методов. Декальцинацию костей после их предварительной фиксации в формалине осуществляли, погружая их в смесь 8% соляной и 10% муравьиной кислот согласно принятому протоколу [29].

Продольные срезы средней части диафиза правой и левой бедренной кости ( $n = 8$ ) толщиной 4 мкм окрашивали гематоксилином Майера и эозином. Толщину трех частей компактного вещества диафиза — остеоидного слоя, слоев наружных и внутренних общих костных пластинок, а также количество костных пластинок остеоидного слоя измеряли в каждом срезе пять раз с пошаговым интервалом 50 мкм ( $n$ , общее число подсчетов = 40). Количество остеоцитов подсчитывали в остеоидном слое на площади каждого среза, равной 0,5 мм<sup>2</sup>.

Состояние обмена коллагена в костной ткани оценивали методом атомно-абсорбционной спектроскопии по содержанию в гомогенате эпифиза бедренной кости суммарного коллагена, рассчитанного по количеству гидроксипролина [30, 31]. Изучение минерального компонента костной ткани выполнено с помощью атомно-адсорбционной спектрометрии (спектрометр фирмы Varian). Маркеры костного ремоделирования (остеокальцин (ОК), склеростина, остеопротегерина (OPG), фактора роста фибробластов-23 (FGF23) и лиганда активатора ядерного фактора каппа-β (*RANKL*) в сыворотке крови при остеопорозе определяли с помощью ИФА-наборов для иммуноферментного анализа.

Объектом исследования являлся создаваемый лекарственный препарат на основе солей янтарной кислоты, средство для лечения остеопороза (далее — препарат Х3, патент на изобретение RU 2582973С1) [32]. Данное исследование входит в комплекс доклинических исследований, необходимых для регистрации продукта, и направлено на установление свойства тестируемого объекта при многократном пероральном введении в фиксированной дозе (62,5 мг/кг). Исследование проводилось в соответствии с требованиями к лабораторным исследованиям стандарта GLP [33].

При использовании пакета статистической программы GraphPad PRISM 6.0 (GraphPad Software, USA) было установлено, что распределение параметров каждого вариационного ряда было отличным от нормального. Поэтому для установления достоверности различий величин вычисляли их медиану, верхний и нижний квартили, которые сравнивали, используя непараметрический критерий Манна-Уитни. Различия считали значимыми при  $p < 0,01$ .

## Результаты исследования и обсуждение

### 1. Установление гистоморфологических изменений элементов костной ткани диафизов бедренных костей при остеопорозе и после заместительной терапии

Слои компактного вещества кости и составляющие их костные пластинки в продольно срезанных диафизах бедренных костей у контрольных крыс были ориентированы преимущественно правильным прямолинейным образом.

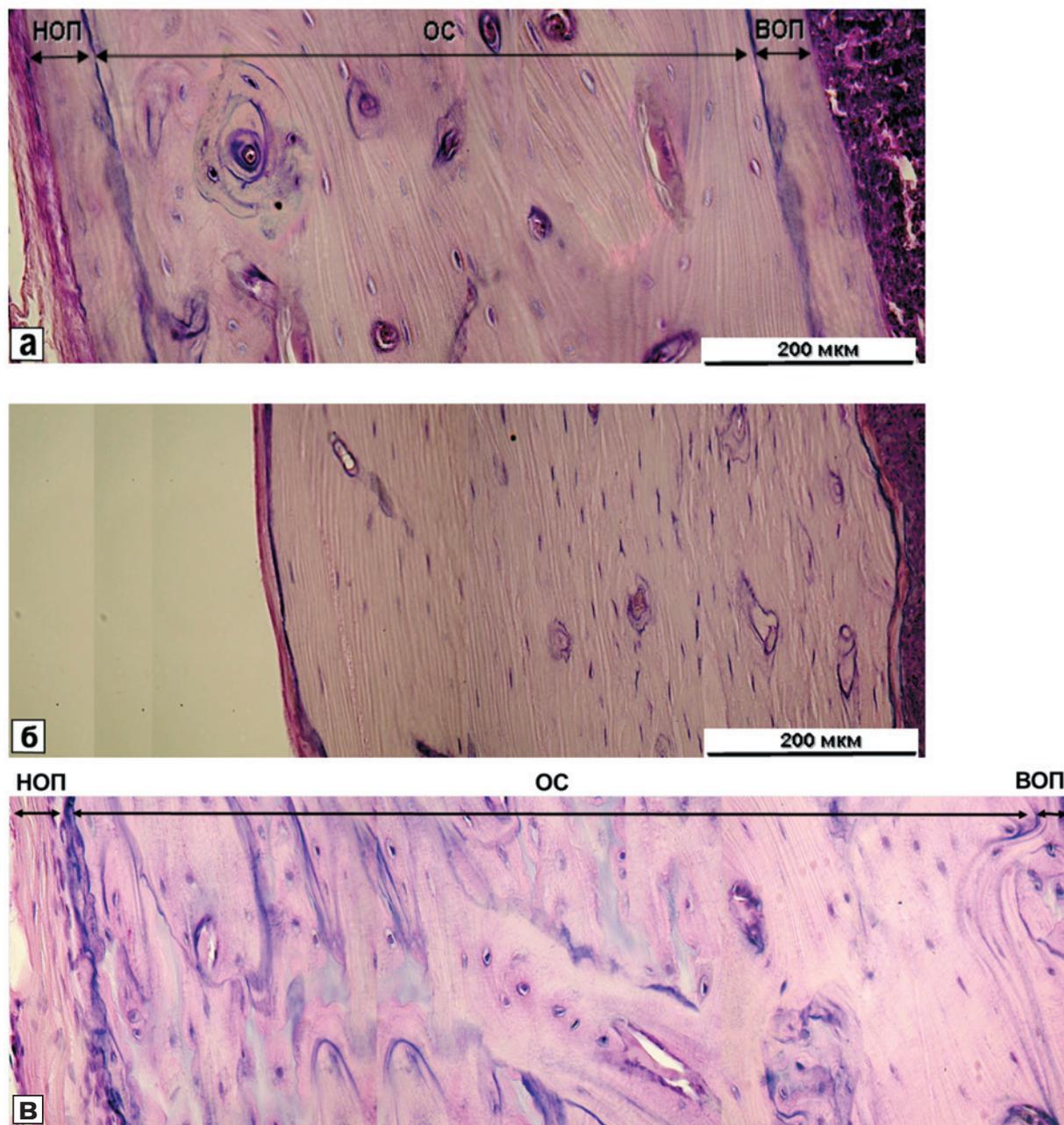
В результате моделирования остеопороза в компактном веществе диафизов бедренных костей происходило уменьшение размеров и сморщивание остеоцитов, уменьшение размеров и деформация компонентов остеонов, истончение слоев компактного вещества, уменьшение числа костных пластинок и остеоцитов в остеоидном слое (рис. 1, табл. 1 и 2). При этом дегенеративно измененные костные пластинки и слои компактного вещества кости сохранили продольную упорядоченную архитектонику.

После моделирования остеопороза и воздействия препарата Х3 наблюдалось восстановление размеров и формы как остеоцитов, так и остеонов, определяемых визуально, расширение слоев компактного вещества, увеличение числа костных пластинок и остеоцитов до значений, значительно превышающих соответствующие параметры у контрольных крыс. Вместе с тем многие костные пластинки и слои кости были расположены иррегулярно.

Таким образом, моделирование остеопороза эндокринно-хирургическим способом индуци-

рует выраженные дегенеративные изменения остеоцитов и их производных во всех отделах компактного вещества кости. Использование при остеопорозе тестируемого препарата ХЗ стиму-

лирует регенераторный остеогенез, восстанавливает исходное строение элементов костной ткани, однако нарушает ее архитектуру.



**Рис. 1. Строение средней части диафиза бедренной кости в продольном сечении:**

а — контроль, б — после моделирования остеопороза, в — после остеопороза и терапии препаратом ХЗ. Обозначения компонентов компактного вещества кости: НОП — наружные общие пластинки, ОС — остеоидный слой, ВОП — внутренние общие пластинки. Окрашивание декальцированной кости гематоксилином Майера и эозином; ок. x10, об. 40

**Figure 1. Structure of the midshaft of the femur in longitudinal section:**

а — control, б — after modeling osteoporosis, в — after osteoporosis and treatment with drug X3. Designations of bone compact substance components: NOF — outer cortical plates, OS — osteoid layer, ICP — inner cortical plates. Staining of decalcified bone with Mayer's hematoxylin and eosin; mag. x10, obj. 40

**Таблица 1. Толщина компактного вещества диафиза бедренной кости при остеопорозе и после терапии производным янтарной кислоты у крыс (25 %/Med/75 %)**

**Table 1. Thickness of the compact substance of the femur diaphysis in osteoporotic rats and after treatment with amber acid derivative (25 %/Med/75 %)**

Способ воздействия	Толщина (мкм)		
	наружных общих пластинок	остеоидного слоя	внутренних общих пластинок
Нет (интактные крысы)	55,6 / <b>61,1</b> / 72,2	638,9 / <b>672,2</b> / 694,4	55,5 / <b>61,0</b> / 64,8
Остеопороз	35,1 / <b>41,0</b> / 48,0*	392,7 / <b>431,9</b> / 461,8*	30,6 / <b>37,6</b> / 43,7*
Остеопороз и лечение	87,6 / <b>93,3</b> / 104,2**	947,5 / <b>986,9</b> / 1004,0**	77,7 / <b>87,7</b> / 93,1**

Примечание: \* — различия с параметрами у контрольных животных значимы (P value < 0,0001); \*\* — различия с параметрами у опытных крыс значимы (P value < 0,0001); количество подсчетов (n) = 40.

Note: \* — differences from parameters in control animals are significant (P value < 0.0001); \*\* — differences from parameters in experimental rats are significant (P value < 0.0001); number of measurements (n) = 40.

**Таблица 2. Количественные параметры остеоидного слоя диафиза бедренной кости при остеопорозе и после терапии производным янтарной кислоты у крыс (25 %/Med/75 %)**

**Table 2. Quantitative Parameters of the Osteoid Layer of the Femur Diaphysis in Osteoporotic Rats and After Treatment with Amber Acid Derivative (25 %/Med/75 %)**

Способ воздействия	Количество	
	костных пластинок (число подсчетов n = 40)	остеоцитов (число подсчетов n = 8)
Нет (интактные крысы)	28,3 / <b>30,1</b> / 32,4	46,7 / <b>52,5</b> / 57,2
Остеопороз	18,9 / <b>20,0</b> / 21,2*	21,2 / <b>25,1</b> / 26,7*
Остеопороз и лечение	33,0 / <b>34,3</b> / 35,1**	86,1 / <b>90,0</b> / 93,3**

Примечание: \* — различия с параметрами у контрольных животных значимы (P value < 0,0001); \*\* — различия с параметрами у опытных крыс значимы (P value < 0,0001).

Note: \* — differences from parameters in control animals are significant (P value < 0.0001); \*\* — differences from parameters in experimental rats are significant (P value < 0.0001).

## **2. Содержание коллагена и кальция в диафизах костей у самок крыс с экспериментальным остеопорозом**

При ОП у животных сенильного возраста (ОП2) отмечается достоверное снижение содержания кальция и коллагена, основных показателей органического и минерального компонентов костной ткани. При этом снижение кальция у молодых крыс (ОП1) было недостоверным по сравнению с контролем, вероятно, ввиду противодействия сильных компенсаторных механизмов кальциевого гомеостаза костной ткани.

Изменение содержания коллагена позволяет судить о характере изменений в белковом матриксе костной ткани. Состояние обмена коллагена в костной ткани оценивали по содержанию в гомогенате диафиза бедренной кости суммарного коллагена, рассчитанному по количеству гидроксипролина (рис. 2). На ускорение синтеза коллагена указывает увеличение содержания суммарного коллагена в костной ткани по сравнению с контрольной группой. Содержание оксипролина в костной ткани животных опытных групп после терапии препаратом ХЗ менялось в разной степе-

ни. У молодых крыс с экспериментальным остеопорозом препарат ХЗ значительно увеличивал содержание оксипролина (на 17,5 %,  $p < 0,05$ ), хотя и не достигал значений интактной группы, возможно из-за кратковременности назначения и особенностей метаболизма костной ткани у молодых крыс, что предполагает более длительное назначение препаратов для восстановления и завершения костного ремоделирования. У сенильных самок (control 2) снижение коллагена после формирования остеопороза было более выраженным, и назначение препарата оказывало более значимое терапевтическое действие — рост концентрации оксипролина составил 21, 2 % ( $p < 0,05$ ).

Следовательно, эффективность предлагаемого антиостеопорозного средства ХЗ достаточна для увеличения белкового матрикса костной ткани и восстановления органической компоненты костной ткани до приемлемого уровня по сравнению с контрольной группой. При этом препарат ХЗ более мягко увеличивает содержание кальция в костной ткани, без явной кальциевой перегрузки, которая может увеличивать ее ломкость.

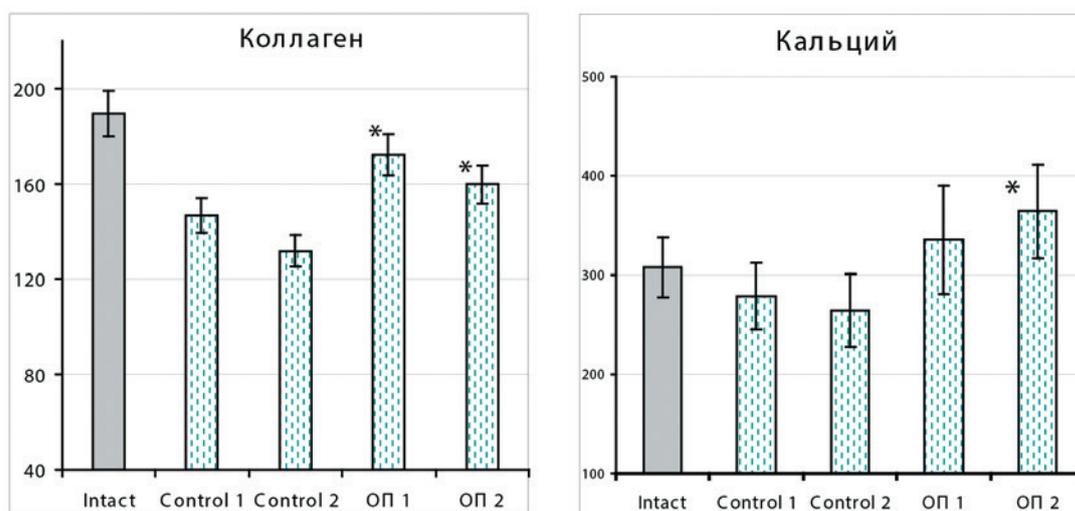
Таким образом, 30-дневное пероральное назначение препарата ХЗ значительно увеличивало содержа-

ние суммарного коллагена в костной ткани по сравнению с контрольной группой, как у старых, так и молодых крыс. При этом интенсивность синтеза коллагена более выражена у сенильных крыс.

### 3. Оценка маркеров костного ремоделирования в периферической крови

Костное ремоделирование представляет собой непрерывный процесс, посредством которого происходит обновление кости с целью сохранения ее прочности и минерального гомеостаза, при этом формирование и резорбция являются тесно связанными процессами. В процессе ремоделирования взамен старой костной ткани образуется новая ткань. Цикл ремоделирования костной ткани составляет 5-6 месяцев и изначально запускается остеобластами за счет синтеза RANKL и OPG. RANKL, связываясь с RANK-рецепторами остеокластов и их предшественниками, стимулирует их дифференцировку и активность, тогда как OPG блокирует RANK-рецепторы, ингибируя функцию остеокластов [34].

Как видно из рисунка 3, лиганды рецептора RANKL при формировании остеопороза повышаются, возможно, как компенсаторная реакция



**Рис. 2. Содержание коллагена (в ммоль/кг) и кальция (в мг/г) в диафизе самок крыс с экспериментальным остеопорозом на фоне терапии антиостеопорозным препаратом**

Примечание: ОП1 — опытная группа 4-6-месячных молодых самок, получавших антиостеопорозное средство (62,5 мг/кг). ОП2 — опытная группа 12-14-месячных самок, получавших антиостеопорозное средство (62,5 мг/кг). \* —  $p < 0,05$ , различие значимо по сравнению с параметрами контрольной группы и 12-14-месячных крыс.

### Figure 2. Collagen content (in mmol/kg) and calcium content (in mg/g) in the diaphysis of female rats with experimental osteoporosis treated with an anti-osteoporosis drug

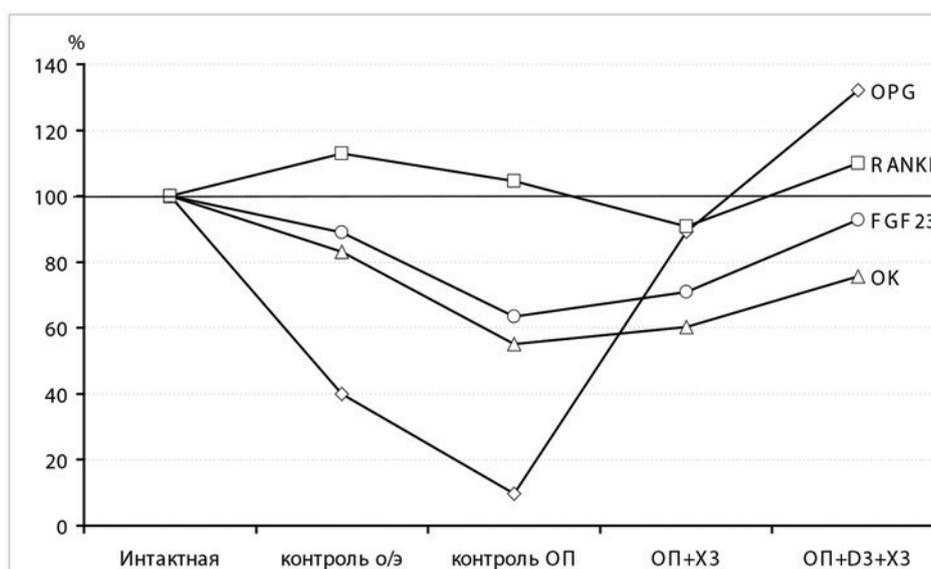
Note: EP1 — experimental group of 4-6-month-old young females receiving the anti-osteoporosis agent (62.5 mg/kg). EP2 — experimental group of 12-14-month-old females receiving the anti-osteoporosis agent (62.5 mg/kg). \* —  $p < 0.05$ , the difference is significant compared to the control and 12-14-month-old rats.

на активацию резорбции костной ткани, соответственно, в большем количестве попадают в циркулирующую кровь. В дальнейшем, на этапе коррекции экспериментального ОП, содержание RANKL в крови уменьшается, что свидетельствует о снижении его выработки остеобластами, в связи с активацией остеокластогенеза.

Важная роль в синтезе костного матрикса принадлежит остеокальцину. ОК — это белок, вырабатываемый остеобластами, способный связывать кальций и стабилизировать четвертичную структуру коллагена, контролируя сборку костного матрикса — остеона. Как видно из рисунка, уровень ОК по мере формирования остеопороза снижается и снижение его концентрации в крови отражает снижение выработки коллагена остеобластами. Назначение антиостеопорозного препарата ХЗ и в комбинации с витамином ДЗ приводит к значимому росту концентрации ОК в крови, что свидетельствует об усилении остеогенеза, остеобластогенеза. На фоне терапии препаратом ХЗ снижается и концентрация RANKL в крови, что также свидетельствует об активации остеобластов и снижении необходимости потенциации остеобластов за счет синтеза RANKL.

Также очень важной является динамика остеопротегерина. При костном ремоделировании OPG, в свою очередь, блокирует RANK-рецепторы, ингибируя функцию остеокластов [34–38]. Ингибируя связывание RANK с RANK-лигандом, OPG тем самым подавляет мобилизацию, пролиферацию и активацию остеокластов, поэтому увеличение синтеза RANKL приводит к резорбции костной ткани и, следовательно, к потере костной массы. Как видно из рисунка 2, снижение OPG наиболее выражено при формировании ОП, когда наиболее выражена резорбция костной ткани из-за активации остеокластов. Отмечается достоверное и многократное падение уровня OPG. Необходимо отметить, что более резкое снижение OPG происходит сразу после овариоэктомии, что свидетельствует о гормон-зависимом характере этого процесса. Назначение препарата ХЗ восстанавливает исходный уровень OPG в крови, а комбинация ХЗ с витамином ДЗ вызывает значительное достоверное повышение концентрации OPG по сравнению с интактной группой.

Важным показателем, характеризующим остеогенез, является FGF-23, который экспрессируется



**Рис. 3. Изменения содержания маркеров остеопороза ОК, OPG, FGF23 и RANKL в сыворотке крови на этапах формирования экспериментальной модели остеопороза и его фармакотерапии препаратом ХЗ и витамином ДЗ. Данные интактных крыс приняты за 100 %**

Сокращения (здесь и далее): о/э — овариоэктомия; оп — остеопороз; ОП+ХЗ — группа, получавшая препарат ХЗ; ОП+ХЗ+ДЗ — группа, получавшая препарат ХЗ и витамин ДЗ.

**Figure 3. Changes in the levels of osteoporosis markers OK, OPG, FGF23, and RANKL in the blood serum at the stages of experimental osteoporosis model formation and its pharmacotherapy with drug X3 and vitamin D3. Data from intact rats are taken as 100 %**

Abbreviations used here and throughout: o/e — ovariectomy; OP — osteoporosis; OP+X3 — group receiving drug X3; OP+X3+D3 — group receiving drug X3 and vitamin D3.

преимущественно в костной ткани и синтезируется остеоцитами. Его основная роль сводится к снижению уровня сывороточного фосфата [35]. FGF-23 регулирует уровень сывороточного фосфата и активность витамина Д. Поскольку витамин Д стимулирует канальцевую реабсорбцию фосфатов, снижение его концентрации в крови приводит к подавлению реабсорбции и снижению уровня фосфатов крови. Данные рисунка 2 свидетельствуют, что снижение уровня FGF-23 коррелирует со снижением содержания Ca и P в крови [12].

Активные формы витамина Д3 повышают экспрессию гена FGF-23, формируя тем самым отрицательную обратную связь в регуляции канальцевой реабсорбции фосфатов. В группе с ОП с комбинированной терапией ХЗ и Д3 наблюдается более значимый рост концентрации FGF-23 в крови, чем при монотерапии с ХЗ (рис. 3). В свою очередь, повышение уровня FGF-23 приводит к снижению уровня активной формы витамина Д в крови [36].

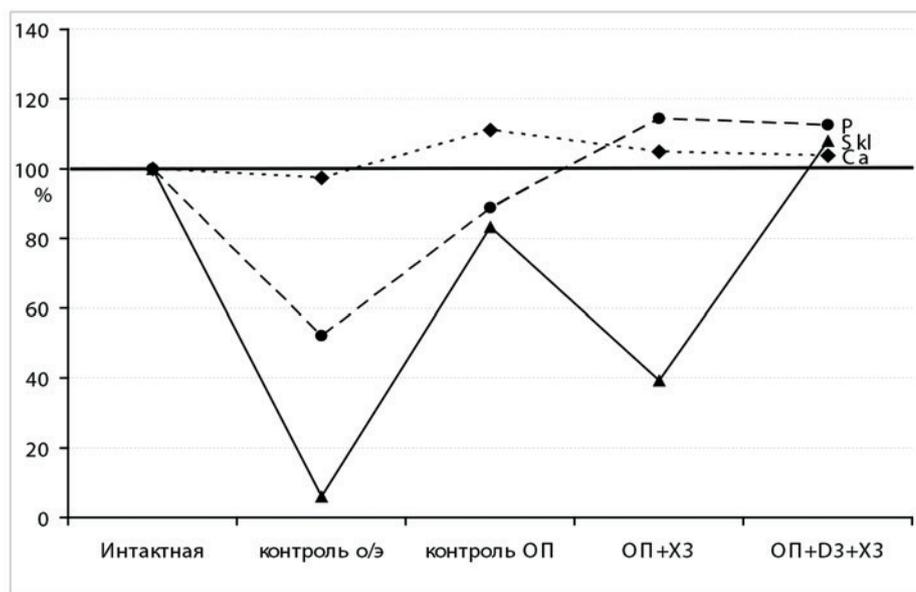
Склеростин является компонентом семейства гликопротеинов, экспрессируется в остеоцитах и некоторых хондроцитах, он ингибирует образование костей остеобластами. На поверхности остеоицита Skl связывается с корцепторами, способствует прерыванию Wnt-сигнализации, замед-

ляя процесс остеобластогенеза и формирование костной ткани [30–37].

Как видно из рисунка 4, при формировании ОП повышается уровень Skl, а после назначения препаратов ХЗ происходит падение его уровня. Комбинированная терапия ХЗ с витамином Д3 нормализует уровень Skl. Таким образом, Skl, который играет важную роль в метаболизме костной ткани, регулирует активность остеобластов с помощью системы отрицательной обратной связи [38]. При замедлении функций Skl снижается резорбция кости и происходит стимуляция повторного роста костной ткани.

Надо сказать, что экспрессия Skl в остеоцитах в значительной степени регулируется гормонами, влияющими на метаболизм костной ткани: паратиреоидным гормоном, кальцитонином и глюкокортикоидами. Показано [39], что уровень Skl в сыворотке крови обратно пропорционален уровню эстрогенов и достоверно высок у женщин в постменопаузе.

Данные, приведенные на рисунке, свидетельствуют о зависимости динамики уровня Skl от двусторонней овариэктомии, после которой происходит его резкое снижение и последующий рост по мере формирования ОП, он коррелирует с динамикой уровня эстрогенов в крови. Уровень



**Рис. 4.** Изменения склеростина (Skl), ионов Ca и P в сыворотке крови на этапах формирования экспериментальной модели остеопороза и его фармакотерапии препаратом ХЗ и витамином Д3. Данные интактных крыс приняты за 100 %

**Figure 4.** Changes in sclerostin (Skl), calcium (Ca), and phosphorus (P) levels in the blood serum at the stages of experimental osteoporosis model formation and its pharmacotherapy with drug X3 and vitamin D3. Data from intact rats are taken as 100 %

фосфора также отражает динамику ОП и его фармакотерапию — снижение при остеопорозе, рост и последующую нормализацию P и Ca до уровня интактной группы. Такая динамика отражает эффективность проводимой антиостеопорозной терапии. Необходимо отметить, что на уровень P в периферической крови влияет не только интенсивность резорбции костной ткани, но и взаимодействие витамина Д3 с экспрессией FGF-23, формируя тем самым отрицательную обратную связь в регуляции канальцевой реабсорбции фосфатов.

Таким образом, назначение антиостеопорозного препарата ХЗ по схеме монотерапии и в комбинации с витамином Д3 приводит к значимому росту концентрации маркеров костного ремоделирования в сыворотке крови, что свидетельствует об усилении остеогенеза, остеобластогенеза.

### Заключение

Разрабатываемый препарат ХЗ, в отличие от других испытанных соединений, обеспечил повышение эффективности профилактики и лечения постменопаузального остеопороза на экспериментальной модели патологии. Использование кислых солей природного конформера солей янтарной кислоты в составе нового препарата, вследствие увеличения биодоступности самой янтарной кислоты, обеспечивает действие на сигнальные системы, биодоступность и усвоение макроэлементов (Ca, Zn, Mg) из его состава. Препарат оказался достаточно эффективным для того, чтобы при 30-кратном введении в течение 30 дней в терапевтической дозе оказать выраженный антиостеопорозный эффект.

Костное ремоделирование — это процесс обновления кости с целью сохранения ее прочности и минерального гомеостаза. Реконструкция включает непрерывное удаление дискретных участков старой кости, замену этих участков вновь синтезированной белковой матрицей с последующей ее минерализацией. Данные настоящего исследования, оценивающие процессы костного ремоделирования при ОП и на фоне антиостеопорозной терапии, показывают эффективность препарата ХЗ, которая значительно усиливается в комбинации с витамином Д3.

Динамика исследуемых нами маркеров костного ремоделирования в сыворотке крови показала, что она отражает процессы остеокласто- и остеобластогенеза, выявляемые другими методами, в частности, определение концентрации макроэлементов и коллагена I типа в костной ткани. Формирование ОП и его последующая фармакотерапия антиостеопорозным препаратом ХЗ в комбинации с витамином Д3 приводит к значимому измене-

нию уровня показателей остеобластогенеза — ОК, OPG в крови, что свидетельствует о потенциации процессов остеогенеза, остеобластогенеза.

На фоне терапии препаратом ХЗ отмечали снижение концентрации RANKL и значительное увеличение уровня OPG в сыворотке крови, что свидетельствует об активации остеобластов и снижении потенциации остеокластов за счет снижения синтеза RANKL. Значительное снижение OPG происходит при формировании ОП, когда наиболее выражена резорбция костной ткани из-за активации остеокластов. Отмечается достоверное и многократное падение уровня OPG сразу после овариэктомии, что свидетельствует о гормонозависимом характере этого процесса.

Таким образом, назначение антиостеопорозного препарата ХЗ в виде монотерапии и в комбинации с витамином Д3 приводит к значимому росту концентрации маркеров костного ремоделирования в сыворотке крови, что свидетельствует об усилении остеогенеза, остеобластогенеза.

В заключение данного исследования можно сказать, что предлагаемое антиостеопорозное средство ХЗ может способствовать более эффективному лечению и профилактике возрастного и постменопаузального остеопороза и остеопороза молодого организма. Основываясь на полученных данных, можно предположить, что разрабатываемая технология лечения остеопороза может оказаться более эффективной, чем принятые в настоящее время схемы, которые связаны с перегрузкой организма кальцием, когда увеличение плотности костной ткани в значительной степени обусловлено не обогащением органической компоненты кальцием, а довольно резким возрастанием минерализации и последующей хрупкости костной ткани. При избранном способе лечения будет уменьшена вероятность риска инвалидизирующих переломов, а, соответственно, снижены финансовые затраты на профилактику, лечение и поддержание жизнедеятельности пациенток, страдающих постменопаузальным остеопорозом.

### Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

### Список литературы / References

1. Bolland MJ, Grey AB, Gamble GD, Reid IR. Effect of osteoporosis treatment on mortality: a meta-analysis // J Clin Endocrinol Metab. 2010. No 95. P. 1174–1181.
2. MacLean C, Newberry S, Maglione M, et al. Systematic review: comparative effectiveness of treatments

to prevent fractures in men and women with low bone density or osteoporosis // *Ann Intern Med.* 2007. No 148. P. 197–213.

3. Cauley JA, Thompson DE, Ensrud KC, et al. Risk of mortality following clinical fractures // *Osteoporosis Int.* 2000. No 11. P. 556–561.

4. Kanis JA. World Health Organization Scientific Group. Assessment of Osteoporosis at the Primary Health-Care Level Technical Report Sheffield. UK: WHO Collaborating Centre, University of Sheffield; 2008.

5. National Osteoporosis Foundation 2004. Disease statistics.

6. National Osteoporosis Foundation. Advocacy News & Updates. American's Bone Health: The State of Osteoporosis and Low Bone Mass. Accessed April 18. 2011.

7. Riggs BL, Melton D. Osteoporosis. Etiology, diagnosis, treatment. CJSC Binom Publishing House. M. 2000. P. 309–313. In Russian [Риггз Б.Л., Мелтон Д. Остеопороз. Этиология, диагностика, лечение. ЗАО «Издательство Бином». М. 2000. С. 309–313].

8. International Osteoporosis Foundation. 2010.

9. EFFO and NOF. Who are candidates for prevention and treatment for osteoporosis? // *Osteoporosis Int.* 1997. No 7. P. 1–32.

10. Management of Osteoporosis in Postmenopausal Women: 2010 Position Statement of The North American Menopause Society // *Menopause.* 2010. Vol.17. No 1. P. 25–54.

11. WHO. FRAX® WHO fracture risk assessment tool: calculation tool. Accessed February 14. 2011.

12. Bairamov AA, Maevskij EI, Shabanov PD. Correction of bone remodeling in experimental osteoporosis. *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy.* 2019;17(4):43–50. doi.org/ 10.17816/RCF17443-50. In Russian [Байрамов А.А., Маевский Е.И., Шабанов П.Д. Коррекция костного ремоделирования при экспериментальном остеопорозе // *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии.* 2019. Т. 17. № 4. С. 43–50].

13. Lesnyak OM. Audit of the state of the problem of osteoporosis in the Russian Federation // *Preventive medicine.* 2011;(2):7–10. In Russian [Лесняк О.М. Аудит состояния проблемы остеопороза в Российской Федерации // *Профилактическая медицина.* 2011. № 2. С. 7–10].

14. Cattail VM, Arki RA. Pathophysiology of the endocrine system. M. Binomi. 2010. 335 p. In Russian [Кеттайл В.М., Арки Р.А. Патопфизиология эндокринной системы. Перевод с англ. М.: Бином. 2010. 335 с.].

15. Povoroznyuk VV, Grigor'eva NV. Menopause and osteoporosis. K.: Health, 2004. 356 p. In Russian [Поворознюк В.В., Григорьева Н.В. Менопауза и остеопороз. К.: Здоровье, 2004. 356 с.].

16. Maevskij EI, Roshchenfel'd AS, Grishina EV, Kondrashova MN. Correction of metabolic acidosis by

maintaining the functions of mitochondria. (monograph). Pushino, ITEB RAS, 2001. 155 p. In Russian [Маевский Е.И., Рощенфельд А.С., Гришина Е.В., Кондрашова М.Н. Коррекция метаболического ацидоза путем поддержания функций митохондрий: монография. Пушино, ИТЭБ РАН. 2001.155 с.].

17. Maevskij EI, Uchitel' ML, Bajramov AA., et al. Correction of hormonal activity with substrate compositions in men and women // *Gastroenterology of St. Petersburg.* 2017;(2–3):55–56. In Russian [Маевский Е.И., Учитель М.Л., Байрамов А.А. и др. Коррекция гормональной активности субстратными композициями у мужчин и женщин // *Гастроэнтерология Санкт-Петербурга.* 2017. № 2–3. С. 55–56].

18. Mitochondrial processes in the temporal organization of life. Edited by M. N. Kondrashova, V. V. Dynnuk, Yu. G. Kaminskij, et al. Pushchino, 1978. 182 p. In Russian [Митохондриальные процессы во временной организации жизнедеятельности: Сб. / Под ред. М. Н. Кондрашовой, В. В. Дынника, Ю. Г. Каминского и др. Пушино, 1978. 182 с.].

19. Therapeutic effect of succinic acid. Sb. Edited by M. N. Kondrashova. Pushchino, 1976. 255 p. In Russian [Терапевтическое действие янтарной кислоты: Сб. / Под ред. М. Н. Кондрашовой. Пушино, 1976. 255 с.].

20. Maevskij EI, Grishina EV, Haustova YaV, et al. Again about preparations containing succinate // *Gastroenterology of St. Petersburg.* 2017;(1):91–92. In Russian [Маевский Е.И., Гришина Е.В., Хаустова Я.В. и др. Вновь о препаратах, содержащих сукцинат // *Гастроэнтерология Санкт-Петербурга.* 2017. № 1. С. 91–92].

21. Vasilieva AA, Simonova MA, Bairamov AA, et al. Correction of the functional state of female rats after unilateral ovariectomy using a succinate containing composition. *Cardiometry,* 2017. No 10. P. 86–92. DOI: 0.12710/cardiometry.2017.8692.

22. Succinic acid in medicine, food industry, agriculture. Sb. Edited by M. N. Kondrashova, Yu. G. Kaminskij, E. I. Maevskij. Pushchino, 1996. 300 p. In Russian [Янтарная кислота в медицине, пищевой промышленности, сельском хозяйстве: Сб. / Под ред. М. Н. Кондрашовой, Ю. Г. Каминского, Е. И. Маевского. Пушино, 1996. 300 с.].

23. Kotelnikov GP, Bulgakov SV. Osteoporosis. M. GEOTAR Mediz. 2010. 504 p. In Russian [Котельников Г.П., Булгаков С.В. Остеопороз. М.: ГЕОТАР-Медиз. 2010. 504 с.].

24. Kronenberg GM, Melmed SH, Polonski KS, Larsen PR. Endocrinology according to Williamson. Reproductive endocrinology. M. Reid Elsvier. 2011. 410 p. In Russian [Кроненберг Г.М., Мелмед Ш., Полонски К.С., Ларсен П.Р. Эндокринология по Вильямсону. Репродуктивная эндокринология. Перевод с англ. М.: Рид Элсивер. 2011. 410 с.].

25. Hodzhkin S. Mayo Clinic on Osteoporosis. M.: Astrel. 2007. 237 p. In Russian [Ходжкин С. Клиника Мэйо об Остеопорозе. Перевод с англ. М.: Астрель. 2007. 237 с.].
26. Levitskiy AP, Makarenko OA, Den'ga OV, et al. Eksperimental'nye metody issledovaniya stimulyatorov osteogeneza: metodicheskie rekomendatsii. Kiev: Avitsenna; 2005. P. 31–38. In Russian [Левицкий А.П., Макаренко О.А., Денга О.В. и др. Экспериментальные методы исследования стимуляторов остеогенеза: Методические рекомендации. Киев: Авиценна, 2005. С. 31–38].
27. Frol'kis V, Povoroznyuk V, Evtushenko O, Grigorieva N. Eksperimental'nyy osteoporoz. Doctor. 2003;(6):48–52. In Russian [Фролькис В.В., Поворознюк В.В., Евшушенко О.А., Григорьева Н.В. Экспериментальный остеопороз // Doctor. 2003. № 6. С. 48–52].
28. Bairamov AA, Mamina NSh, Karonova TL, Shabanov PD. Possibilities of *in vivo* validation of a model of experimental osteoporosis. Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy. 2020;18(4):365–367. In Russian [Байрамов А.А., Мамина Н.Ш., Каронова Т.Л., Шабанов П.Д. Возможности прижизненной валидации модели экспериментального остеопороза // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2020. Т. 18. № 4. С. 365–367]. DOI: 10.7816/RCF184365-367.
29. Zamaraeva TV. Method for determining the content of collagen proteins by hydroxyproline // Modern methods in biochemistry. M.: Medicine, 1977. С. 262–264. In Russian [Замараева Т.В. Метод определения содержания коллагеновых белков по оксипролину // Современные методы в биохимии. М.: Медицина, 1977. С. 262–264].
30. Bertchenko GN, Lipkin SM. Features of Bone Tissue Research. In: Microscopic Techniques: A Guide for Physicians and Laboratory Technicians. Edited by D. S. Sarkisov, Yu. L. Perov. Moscow: Meditsina, 1996. P. 463. In Russian [Берченко Г.Н., Липкин С.М. Особенности исследования костной ткани. В кн.: Микроскопическая техника: Руководство для врачей и лаборантов. / Под ред. Д. С. Саркисова и Ю. Л. Перова. М.: Медицина, 1996. С. 463].
31. Sharayev PN. Method for determining free and bound hydroxyproline in blood serum. Laboratory Work. 1981;(5):283–285. In Russian [Шараев П.Н. Метод определения свободного и связанного оксипролина в сыворотке крови // Лабораторное дело. 1981. № 5. С. 283–285].
32. Patent RUS2582973C1. Bajramov AA, Shabanov PD, Maevskij EI, et al. Antiosteoporoznoe sredstvo. In Russian [Патент на изобретение RU2582973C1. Байрамов А.А., Шабанов П.Д., Маевский Е.И. и др. Антиостеопорозное средство].
33. GOST 33044-2014 "Principles of Good Laboratory Practice". In Russian [ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики»].
34. Vega D, Maalouf NM, Sakhaee K. The role of receptor activator of nuclear factor-kappaB (RANK)/RANK ligand/osteoprotegerin: clinical implications // J Clin Endocrinol Metab. 2007. Vol. 92. No 12. P. 4514–4521.
35. Dobronravov VA. Modern Insights into the Pathophysiology of Secondary Hyperparathyroidism: The Role of Fibroblast Growth Factor 23 and Klotho. Nephrology. 2011;(4):11–20. In Russian [Добронравов В.А. Современный взгляд на патофизиологию вторичного гиперпаратиреоза: роль фактора роста фибробластов 23 и Klotho // Нефрология. 2011. No. 4. С. 11–20].
36. Shutov EV. Significance of fibroblast growth factor-23 in patients with chronic kidney disease — a review of modern research // Attending physician. 2012. No. 8. P. 35–42. In Russian [Шутов Е.В. Значение фактора роста фибробластов-23 у больных хронической болезнью почек — обзор современных исследований // Лечащий врач. 2012. № 8. С. 35–42].
37. Kneissel M. The promise of sclerostin inhibition for the treatment of osteoporosis // IBMS BoneKEy. 2009. No. 6. P. 259–264.
38. Grebennikova TA, Belaya ZhE, Rozhinskaya LYa, Mel'nichenko GA. Canonical signaling pathway of Wnt/ $\beta$ -catenin: from the history of discovery to clinical application // Therapeutic archive. 2016;10(88):74–75. In Russian [Гребенникова Т.А., Белая Ж.Е., Рожинская Л.Я., Мельниченко Г.А. Канонический сигнальный путь Wnt/ $\beta$ -катенин: от истории открытия до клинического применения // Терапевтический архив. 2016. Т. 10, № 88. С. 74–81].
39. Sims NA, Chia LY. Regulation of sclerostin expression by paracrine and endocrine factors // Clin Rev Bone Miner Metab. 2012. No.10. P. 98–107.

#### Информация об авторах

Лисовский Дмитрий Александрович, аспирант отдела нейрофармакологии им. С. В. Аничкова, ФГБНУ «ИЭМ»;

Дробленков Андрей Всеволодович, д.м.н., профессор (специальность «клеточная биология»), ведущий научный сотрудник отдела нейрофармакологии им. С. В. Аничкова, ФГБНУ «ИЭМ»;

Байрамов Алекбер Азизович, д.м.н., ведущий научный сотрудник Института эндокринологии, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России; ведущий научный сотрудник отдела нейрофармакологии им. С. В. Аничкова, ФГБНУ «ИЭМ»;

Бобков Павел Сергеевич, к.м.н., старший научный сотрудник отдела нейрофармакологии им. С. В. Аничкова; доцент кафедры медико-биологических дисциплин ФГБНУ «ИЭМ»;

Мамина Наиля Шамилевна, аспирант отдела нейрофармакологии им. С. В. Аничкова, ФГБНУ «ИЭМ»;

Фёдоров Никита Алексеевич, лаборант отдела нейрофармакологии им. С. В. Аничкова, ФГБНУ «ИЭМ»;

Каронова Татьяна Леонидовна, д.м.н., заведующая лабораторией клинической эндокринологии Института эндокринологии, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Шабанов Петр Дмитриевич, д.м.н., профессор, заведующий отделом нейрофармакологии им. С. В. Аничкова, ФГБНУ «ИЭМ».

**Authors information:**

Dmitriy A. Lisovskiy, Post-graduate student, Department of Neuropharmacology, Institute of Experimental Medicine;

Andrey V. Droblenkov, MD, Dr. Sci. (Med.), Professor, Leading Research Associate, Department of Neuropharmacology named after S. V. Anichkov, Institute of Experimental Medicine;

Alekber A. Bairamov, Dr. Med. Sci. (Pharmacology), Leading Researcher, Institute of Endocrinology, Almazov National Medical Research; Leading Researcher, Department of Neuropharmacology, Institute of Experimental Medicine;

Pavel S. Bobkov, MD, Cand. Sci. (Med.), Senior Research Associate, Department of Neuropharmacology named after S. V. Anichkov; Assistant Professor, Department of Biomedical Disciplines, Institute of Experimental Medicine;

Nailya Sh. Mamina, Post-graduate student, Department of Neuropharmacology, Institute of Experimental Medicine;

Nikita A. Fedorov, laboratory assistant, Department of Neuropharmacology, Institute of Experimental Medicine;

Tatiana L. Karonova, Dr. Med. Sci. (Endocrinology), Head of the Laboratory of Clinical Endocrinology, Institute of Endocrinology, Almazov National Medical Research Centre;

Petr D. Shabanov, Dr. Med. Sci. (Pharmacology), Professor and Head, Department of Neuropharmacology, Institute of Experimental Medicine.

ВЛИЯНИЕ ФАКТОРА ВОЗРАСТА И ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ  
*ACE* И *PAI-1* НА ТЯЖЕСТЬ ТЕЧЕНИЯ НОВОЙ КОРОНАВИРУСНОЙ  
ИНФЕКЦИИ (SARS-COV-2)

Богданов Д. С., Черкашин Д. В., Улятовский В. А.,  
Шуленин К. С., Ефимов С. В., Мякошина Л. А., Буценко С. А.

Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования «Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

**Контактная информация:**  
Богданов Дмитрий Сергеевич,  
Военно-медицинская академия  
им. С. М. Кирова,  
ул. Академика Лебедева, д. 6,  
Санкт-Петербург, Россия, 194044.  
E-mail: dimbog91@mail.ru

Статья поступила в редакцию 10.05.2023  
и принята к печати 04.09.2023.

**Резюме**

В работе исследуется роль ассоциации полиморфных вариантов генов тканевого ингибитора активатора плазминогена 1 (*PAI-1*) и ангиотензинпревращающего фермента (*ACE*) у 244 пациентов с коронавирусной инфекцией с различной степенью тяжести заболевания (легкая, среднетяжелая и группа умерших). Также исследуется влияние фактора возраста в совокупности с различными генотипами на течение коронавирусной инфекции.

Анализ частот аллелей и генотипов *ACE* обнаружил статистически значимые различия: аллель D ассоциирован со степенью тяжести и исходом COVID-19. Генотип *I/D* ассоциирован с более легким течением болезни, в то время как генотип *D/D* увеличивает вероятность летального исхода.

**Ключевые слова:** возраст, генотип, коронавирусная инфекция, *ACE*, *D*-аллель, *PAI-1*.

Для цитирования: Богданов Д.С., Черкашин Д.В., Улятовский В.А. и др. Влияние фактора возраста и полиморфизма генов *ACE* и *PAI-1* на тяжесть течения новой коронавирусной инфекции (SARS-CoV-2). Трансляционная медицина. 2023;10(6):549-556. DOI: 10.18705/2311-4495-2023-10-6-549-556. EDN: LQCSTQ

# INFLUENCE OF THE AGE FACTOR AND *ACE* AND *PAI-1* GENE POLYMORPHISM ON THE SEVERITY OF THE NEW CORONAVIRUS INFECTION (SARS-COV-2)

Dmitry S. Bogdanov, Dmitry V. Cherkashin, Viktor A. Ulyatovskiy, Konstantin S. Shulenin, Semen V. Efimov, Liliya A. Myakoshina, Sergey A. Butsenko

Federal state budgetary military educational institution of higher education "Military Medical Academy named after S. M. Kirov" of the Ministry of defence of the Russian Federation, Saint Petersburg, Russia

## Corresponding author:

Dmitry S. Bogdanov,  
Military Medical Academy named after  
S. M. Kirov,  
Akademika Lebedeva str., 6,  
Saint Petersburg, Russia, 194044.  
E-mail: dimbog91@mail.ru

Received 10 May 2023; accepted  
04 September 2023.

## Abstract

The paper investigates the role of the association of polymorphic variants of the tissue plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) and angiotensin-converting enzyme (ACE) genes in 244 patients with coronavirus infection with varying degrees of disease severity (mild, moderate, and the group of deaths). The influence of the age factor in conjunction with various genotypes on the course of coronavirus infection is also being studied.

An analysis of the frequencies of alleles and genotypes of ACE found statistically significant differences: the D allele is associated with the severity and outcome of COVID-19. The I/D genotype is associated with a milder course of the disease, while the D/D genotype increases the likelihood of death.

**Key words:** *ACE*, age, coronavirus infection, *D*-allele, genotype, *PAI-1*.

*For citation: Bogdanov DS, Cherkashin DV, Ulyatovskiy VA, et al. Influence of the age factor and ACE and PAI-1 gene polymorphism on the severity of the new coronavirus infection (SARS-CoV-2). Translyatsionnaya meditsina=Translational Medicine. 2023;10(6):549-556 (In Russ.) DOI: 10.18705/2311-4495-2023-10-6-549-556. EDN: LQCCTQ*

**Список сокращений:** АПФ — ангиотензинпревращающий фермент, ИБС — ишемическая болезнь сердца, НКИ — новая коронавирусная инфекция, РААС — ренин-ангиотензин-альдостероновая система, ПЦР — полимеразная цепная реакция, ХОБЛ — хроническая обструктивная болезнь легких, *ACE* — angiotensin-converting enzyme, *PAI-1* — plasminogen activator inhibitor-1/ингибитор тканевого активатора плазминогена.

## Введение

Прогрессирование и введение принципов персонализированной медицины обеспечило широкое применение молекулярно-генетических исследований в клинической практике. С учетом эпидемиологиче-

ской обстановки и механизма проникновения в клетку SARS-CoV-2 изучение генетических особенностей у больных с новой коронавирусной инфекцией (COVID-19) стало особенно актуальным. Как установлено, взаимосвязь тяжести течения COVID-19 с определенными аллельными вариантами генов, ответственных за проникновение вируса в клетку и развитие осложнений, может использоваться для выявления лиц с предрасположенностью к тяжелому течению инфекции и даже смертельному исходу [1].

Кроме того, тяжелое течение COVID-19 характеризуется тромботическими осложнениями, что, скорее всего, может быть связано с полиморфизмом генов, регулирующих экспрессию факторов свертывающей системы крови.

В связи с вышеизложенным изучение полиморфизмов генов ангиотензинпревращающего фермента (*ACE*) и ингибитора тканевого активатора плазминогена (*PAI-1*) представляет особый интерес.

Проникновение в клетку вируса происходит путем взаимодействия S белка с ангиотензинконвертирующим ферментом 2, который является основным рецептором на мембране клетки. Большая часть защитных антител, в том числе и тех, которые индуцированы вакцинацией, специфичны к S белку, что мешает его взаимодействию с ACE2 рецептором. Как ген *ACE2*, так и ген *ACE*, который является его прямым антагонистом, относятся к генам ренин-ангиотензин-альдостероновой системы (РААС), контролирующим этот процесс.

Ген *ACE* картирован на хромосоме 17 (17q23) и отвечает за синтез ангиотензинпревращающего фермента (АПФ), участвующего в регуляции артериального давления и электролитного баланса. АПФ находится в легочных и почечных клетках эндотелия и способствует превращению ангиотензина I в ангиотензин II, являясь мощным вазопресором и альдостеронстимулирующим веществом. Кроме того, фермент способен инактивировать брадикинин, который выступает в качестве вазодилатора [2].

Генетическая изменчивость *ACE* достаточно хорошо изучена, и большинство данных относится к полиморфизму rs4340 (Alu I/D), представляющему собой вставку (инсерция, I) или потерю (делеция, D) Alu-повтора, который влияет на уровень АПФ в сыворотке крови и тканях. Носители аллеля I/I генотипа имеют меньшее содержание АПФ, чем носители D/D генотипа [3], что ассоциируется с развитием сердечно-сосудистых заболеваний [4, 5].

Гомозиготность по D-аллелю коррелировала с развитием тромбоэмболии у субъектов без предрасположенности к другим заболеваниям или изменениям, связанным с нарушениями в свертывающей системе крови [6], поэтому, скорее всего, генотип D/D ассоциируется с тяжелым течением COVID-19, а также его осложнениями.

Процесс фибринолиза в организме связан с активацией плазминогена и деградацией фибрина [7]. Одним из компонентов этого процесса является ингибитор активатора плазминогена *PAI-1* (plasminogen activator inhibitor-1) — многофункциональный белок, фермент острой фазы, член суперсемейства протеазных ингибиторов SERPIN (serine protease inhibitors) [8]. *PAI-1* ингибирует активность тканевого и урокиназного активаторов плазминогена, которые превращают плазминоген через протеолитическое ферментирование в активный фермент плазмин. Плазмин, в свою

очередь, участвует в фибринолизе, разрушая фибриновую сеть тромба, и, блокируя фибринолиз, способствует процессу тромбообразования.

Установлена связь между *PAI-1* и различными патологическими состояниями, такими как сердечно-сосудистые заболевания, злокачественные новообразования, метаболические нарушения, фиброз тканей, воспаление и нейродегенеративные заболевания [9].

Экспрессия *PAI-1* зависит от полиморфизма rs1799889. Имеются данные, что полиморфизм 4G/5G увеличивает риск тромботических осложнений у пациентов с ИБС [10].

Коронавирусная инфекция тяжело протекает у пожилых людей в возрасте 65 лет и старше. Однако известно [11], что высокий риск осложнений и летальных исходов имеют лица работоспособного возраста от 49 лет и старше, при этом риск смертности у них возрастает. Как правило, данная группа больных имеет различные хронические заболевания (гипертоническая болезнь, ИБС, сахарный диабет, бронхиальная астма, ХОБЛ и др.), которые могут осложнять течение инфекции SARS-CoV-2.

С учетом вышеизложенного, исследование полиморфизмов генов ангиотензинпревращающего фермента и ингибитора активации плазминогена I типа, возможно, можно использовать в качестве биомаркеров для прогноза тяжести течения, особенно у лиц старшего возраста с высоким риском осложнений новой коронавирусной инфекции (НКИ).

Целью данного исследования было оценить влияние возраста и степень генетической предрасположенности к неблагоприятному течению COVID-19 в связи с наличием у пациентов различных полиморфных вариантов генов *ACE* и *PAI-1*.

### Материалы и методы

В исследование вошло 244 пациента с новой коронавирусной инфекцией. Диагноз COVID-19 устанавливали на основании клинических данных, данных компьютерной томографии согласно временным методическим рекомендациям профилактики, диагностики и лечения новой коронавирусной инфекции (COVID-19), версия 14 от 27.12.2021, и результатов соскобов со слизистой оболочки носо- и ротоглотки методом ПЦР-теста. Для детекции вируса использовали набор (SARS Коронавирус нуклеиновая кислота ИВД, набор, анализ нуклеиновых кислот, Россия).

Обследуемые разделены на 3 группы: 1-я группа включала 78 пациентов, перенесших коронавирусную инфекцию в легкой форме (в возрасте

от 20 до 76 лет, медиана возраста — 22 года); во 2-й группе обследовано 93 человека, перенесших коронавирусную инфекцию в среднетяжелой форме заболевания (в возрасте от 22 до 75 лет, медиана возраста — 46 лет); в 3-ю группу включили 73 пациента, умерших в стационаре от осложнений COVID-19 (в возрасте от 27 до 75 лет, медиана возраста — 59 лет). По гендерному признаку имелись значимые различия между группами. В 1-й группе было 2 женщины (3%), во 2-й — 13 (14%), а в 3-й — 25 (34%). По медианному возрасту женщины были старше: в 1-й группе медиана возраста мужчин — 22 года, а женщин — 48 лет, во 2-й — 44,5 и 50 лет, а в 3-й — 58 и 66 лет соответственно.

Во всех группах произведен забор биологического материала (кровь) для выполнения молекулярно-генетического исследования полиморфных вариантов генов ангиотензинпревращающего фермента и ингибитора активации плазминогена 1 типа.

Образцы венозной крови собирали в пробирки типа BD Vacutainer. Геномную ДНК выделяли с помощью коммерческого набора НПФ «Литех» (Москва, Россия) по протоколу производителя. Полиморфизм генов *ACE* и *PAI-1* определяли методом аллель-специфичной полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием специфичных праймеров, разработанных НПФ «Литех» на амплификаторе ДТ-Прайм ООО «ДНК-технология» (Россия).

Статистическая обработка результатов исследования осуществлялась с помощью статистиче-

ского пакета программ STATISTICA 7 (StatSoft, USA, Tulsa, OK).

Ассоциации между количественными и дискретными показателями оценивались с помощью критерия Краскела-Уоллиса с применением метода множественных сравнений. Ассоциации между дискретными показателями оценивались с помощью критерия хи-квадрат.

При обнаружении статистически значимой ассоциации и наличии трех и более уровней показателя (подгрупп) бывает важно определить, в чем именно проявляется ассоциация. Для количественных показателей применяется метод множественных сравнений, но для дискретных — общепринятого метода нет. Поэтому был использован метод выделения наиболее сильных различий, дающих вклад в суммарную величину хи-квадрат [12].

Величина хи-квадрат складывается из квадратов относительных отклонений наблюдаемых частот в таблице сопряженности от ожидаемых (если бы ассоциация между двумя дискретными показателями отсутствовала). С учетом поправки Йейтса такие слагаемые имеют вид:  $chi = (o - e - 0,5)^2 / e$ , где  $o$  — наблюдаемое число случаев в ячейке, а  $e$  — ожидаемое (при отсутствии ассоциации).

После построения таблицы сопряженности для пары показателей, продемонстрировавших статистически значимую ассоциацию, для каждой ячейки вычисляются значения  $chi$  и отбираются индивидуально статистически значимые для интерпретации.



Рис. 1. Распределение полиморфных вариантов гена *ACE* у пациентов с COVID-19

Figure 1. Distribution of polymorphic variants of the *ACE* gene in patients with COVID-19

Таблица 1. Сопряженность генотипов гена *ACE* и групп пациентовTable 1. Association between *ACE* gene genotypes and patient groups

Группа	Генотип гена <i>ACE</i>			Всего
	<i>I/I</i>	<i>I/D</i>	<i>D/D</i>	
легкие	22; 29,0 %; 28,2 %	<b>46; 50,6 %; 59,0 %</b>	<b>10; 13,0 %; 12,8 %</b>	78; 32,0 %
среднетяжелые	36; 47,4 %; 38,7 %	31; 34,1%; 33,3 %	26; 33,8 %; 28,0 %	93; 38,1 %
умершие	18; 23,7 %; 24,7 %	<b>14; 15,4 %; 19,2 %</b>	<b>41; 53,3 %; 56,2 %</b>	73; 29,9 %
Всего	76; 31,1 %	91; 37,3 %	77; 31,6 %	244

Таблица 2. Возрастные характеристики подгрупп пациентов относительно каждого из генотипов *ACE*Table 2. Age characteristics of patient subgroups with respect to each of the *ACE* gene genotypes

Группа	Генотип <i>ACE</i>			Всего	p
	<i>I/I</i>	<i>I/D</i>	<i>D/D</i>		
легкие	22,5; (20; 26)	22; (20; 26)	22,5; (22; 23)	22; (20; 26)	0,95
среднетяжелые	44,5; (33,5; 53)	47; (40; 55)	44,5; (36; 51)	46; (36; 52)	0,45
умершие	64,5; (50; 69)	57,5; (52; 69)	60; (46; 68)	59; (48; 69)	0,73

### Результаты и их обсуждение

После получения результатов генетического исследования у пациентов с COVID-19 выделены 3 возможных генотипа ангиотензинпревращающего фермента *ACE* (инсерция-делеция): *I/I*, *I/D* и *D/D*. На рисунке 1 представлено распределение генотипов по группам.

Ассоциация между генотипами гена *ACE* и вариантами течения заболевания оказывается сильно статистически значимой. В таблице 1 приведены численности разных вариантов сочетания генотипа гена *ACE* в трех группах, доли их в % в каждой группе и доли в соответствующем варианте генотипа. Жирным шрифтом выделены данные для вариантов, определяющих ассоциацию.

1. В 1-й группе для варианта *I/D* величина  $\chi^2 = 9,3$ . Если бы ассоциация между этими показателями отсутствовала, наиболее вероятно в таком сочетании нашлось бы 29 пациентов; а их оказалось 46. То есть это сочетание встречается заметно чаще, чем можно было бы ожидать.

2. В 3-й группе для варианта *I/D* величина  $\chi^2 = 6,0$ . Здесь должны были бы умереть 27 пациентов, а умерло 14. Это сочетание более благоприятное.

3. В 1-й группе для варианта *D/D* величина  $\chi^2 = 8,1$ . Если бы ассоциация между этими показателями отсутствовала, наиболее вероятно в таком сочетании нашлось бы 25 пациентов; а их оказалось 10. То есть это сочетание встречается заметно реже, чем можно было бы ожидать.

4. В 3-й группе для варианта *D/D* величина  $\chi^2 = 13,2$ . Здесь должны были бы умереть 23 пациента, а умер 41 больной. Это сочетание наиболее неблагоприятное.

Остальные комбинации оказались менее значимыми.

Таким образом, можно отметить заметное влияние аллеля *D* на течение и исход COVID-19. Генотип *I/D* способствует более легкому течению болезни, в то время как генотип *D/D* увеличивает вероятность летального исхода. Отношение шансов для летального исхода равно 6,08 при 95 % доверительном интервале (2,97; 12,43).

В таблице 2 представлены возрастные характеристики подгрупп (медианы и квартили) и р-значения для их различий в подгруппах.

Различие в возрасте пациентов в группах относительно каждого из генотипов *ACE* оказалось

статистически не значимым, в то время как различие между группами для каждого генотипа оказалось значимое ( $p < 0,0001$ ).

Из литературы известно, что у людей с генотипом *D/D* уровень ангиотензинпревращающего фермента повышен в 2 раза по сравнению с паци-

Таблица 3. Сопряженность генотипов гена *PAI-1* и групп пациентов

Table 3. Association between *PAI-1* gene genotypes and patient groups

Группа	<i>PAI-1</i>			Всего
	<i>5G/5G</i>	<i>5G/4G</i>	<i>4G/4G</i>	
легкие	15; 26,3 %; 19,2 %	37; 31,9 %; 47,4 %	26; 36,6 %; 33,3 %	78; 32,0 %
среднетяжелые	23; 40,4 %; 24,7 %	46; 39,7 %; 49,5 %	24; 33,8 %; 25,8 %	93; 38,1 %
умершие	19; 33,3 %; 26,0 %	33; 28,5 %; 45,2 %	21; 39,6 %; 28,8 %	73; 29,9 %
Всего	57; 23,4 %	116; 47,5 %	71; 29,1 %	244

Таблица 4. Возрастные характеристики подгрупп пациентов относительно каждого из генотипов *PAI-1*

Table 4. Age characteristics of patient subgroups with respect to each of the *PAI-1* gene genotypes

Группа	Генотип			p
	<i>5G/5G</i>	<i>5G/4G</i>	<i>4G/4G</i>	
легкие	21; (20; 23)	22; (21; 24)	23; (20; 26)	0,50
среднетяжелые	43; (32; 55)	47; (35; 53)	46,5; (40; 51,5)	0,85
умершие	58; (42; 66)	58; (50; 69)	63; (50; 69)	0,45

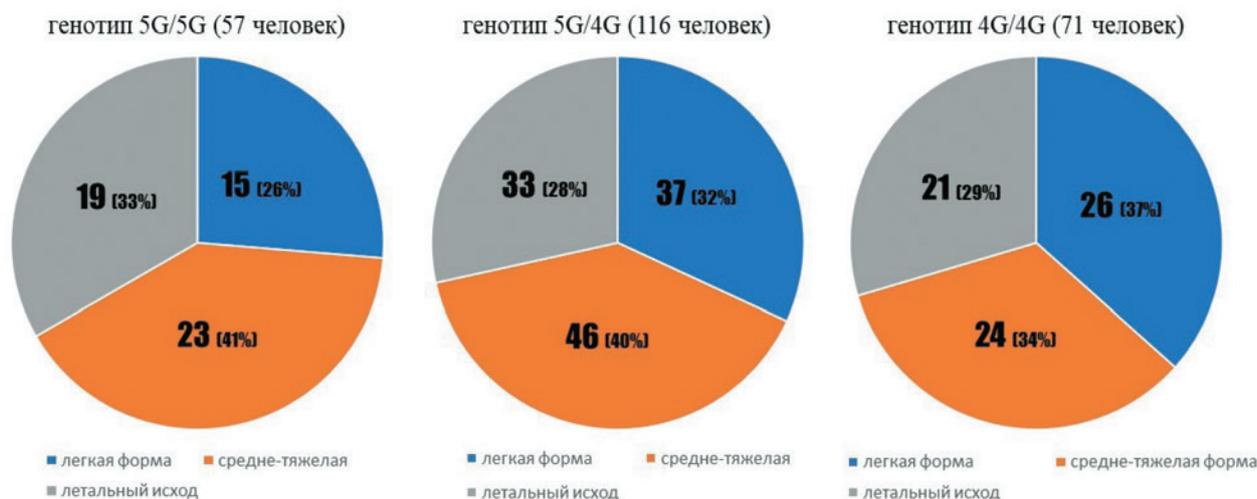


Рис. 2. Распределение полиморфных вариантов гена *PAI-1* у пациентов с COVID-19

Figure 2. Distribution of polymorphic variants of the *PAI-1* gene in patients with COVID-19

ентами, имеющими генотип *I/I* [3], что согласуется с данными, представленными в таблицах. Таким образом, результаты проведенного исследования демонстрируют, что пациенты с генотипом *D/D* имеют больший риск осложнений при коронавирусной инфекции по сравнению с носителями других полиморфных вариантов этого гена.

Исследование полиморфизма *PAI-1* выявило следующие результаты.

Ассоциация между генотипами гена *PAI-1* и вариантами течения заболевания оказывается статистически не значимой ( $p = 0,76$ ). В таблице 3 приведены численности разных вариантов сочетания полиморфных вариантов гена *PAI-1* в трех группах, доли их в процентах в каждой группе и доли в соответствующем варианте генотипа.

В таблице 4 представлены возрастные характеристики подгрупп (медианы и квартили) и  $p$ -значения для их различий в подгруппах.

Различие в возрасте пациентов в группах относительно каждого из генотипов *PAI-1* оказалось статистически не значимым.

#### Выводы

1. *D*-аллель и генотип *D/D* являются важными факторами, влияющими на тяжесть течения заболевания и возможный летальный исход от осложнений SARS-CoV-2.

2. В исследовании фактор возраста относительно каждого генотипа полиморфных вариантов генов *ACE* и *PAI-1* оказался статистически не значимым.

#### Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциально-го конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

#### Список литературы / References

1. Shishimorov IN, Magnitskaya OV, Ponomareva YV. Genetic predictors of the severity of the course and the effectiveness of pharmacotherapy of COVID-19. *Pharmacy and pharmacology*. 2021; 9(3):174–184. In Russian [Шиши-моров И.Н., Магницкая О.В., Пономарева Ю.В. Генети-ческие предикторы тяжести течения и эффективности фармакотерапии COVID-19. *Фармация и фармакологи-я*. 2021;9(3):174–184]. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-3-174-184.

2. Sayed-Tabatabaei FA, et al. ACE polymorphisms. *Circulation research*. 2006;98(9): 1123–1133. DOI: 10.1161/01.RES.0000223145.74217.e7.

3. Timokhina EV, et. al. Polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene ACE significantly increases the risk of developing preeclampsia. *Biochemistry*.

2019;84(2):281–287. In Russian [Тимохина Е.В. и др. По-лиморфизм гена ангиотензинпревращающего фермен-та ACE существенно увеличивает риск развития преэ-клампсии. *Биохимия*. 2019;84(2):281–287]. DOI 10.1134/S0320972519020118. – EDN YVEYAH.

4. Sun F, He N, Zhang K, et al. Association of ACE gene A2350G and I/D polymorphisms with essential hypertension in the northernmost province of China. *Clin Exp Hypertens* 2018;40(1):32–38. DOI: 10.1080/10641963.2017.1291659.

5. Gong H, Mu L, Zhang T, et al. Association of polymorphisms of CYP11B2 gene-344C/T and ACE gene I/D with antihypertensive response to angiotensin receptor blockers in Chinese with hypertension. *Journal of genetics*. 2019;(98):1–5. DOI: 10.1007/s12041-018-1053-2.

6. Yamamoto N, et al. Angiotensin-converting enzyme (ACE) 1 gene polymorphism and phenotypic expression of COVID-19 symptoms. *Genes*. 2021;12(10):1572. DOI: 10.3390/genes12101572.

7. Urano T, et al. Recognition of plasminogen activator inhibitor type 1 as the primary regulator of fibrinolysis. *Current drug targets*. 2019;20(16):1695–1701. DOI: 10.2174/1389450120666190715102510.

8. Shcherbak SG, et. al. Genetic polymorphism of the hemostasis system (literature review). *Bulletin of the North-Western State Medical University I. I. Mechnikov*. 2015;7(4):66–75. In Russian [Щербак С.Г. и др. Генети-ческий полиморфизм системы гемостаза (обзор лите-ратуры). *Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И. И. Мечникова*. 2015; 7(4):66–75].

9. Sillen M, Declerck PJ. A narrative review on plasminogen activator inhibitor-1 and its (patho) physiological role: to target or not to target? *International journal of molecular sciences*. 2021;22(5):2721. DOI: 10.3390/ijms22052721.

10. Parpugga TK, et al. The effect of PAI-1 4G/5G polymorphism and clinical factors on coronary artery occlusion in myocardial infarction. *Disease markers*. 2015; 2015: Article ID 26010. DOI: 10.1155/2015/260101.

11. Butsenko SA, Sergoventsev AA, Kuznetsova RYu, et al. Factors contributing to infection with a new coronavirus infection, increasing the risk of complications and death from it in the armed forces of the Russian Federation. *Bulletin of the Russian Military Medical Academy*. 2023;25(1):121–132. In Russian [Буценко С.А., Серговенцев А.А., Кузнецова Р.Ю. и др. Факторы, способствующие заражению новой коронавирусной инфекцией, повышению риска осложнений и смерти от нее в Вооруженных силах Российской Федерации. *Вестник Российской Военно-медицинской академии*. 2023;25(1):121–132]. DOI: 10.17816/brmma112377.

12. Greenwood PE, Nikulin MS. A guide to chi-squared testing. New York: Wiley, 1996. 280 p.

**Информация об авторах:**

Богданов Дмитрий Сергеевич, адъюнкт кафедры военно-морской терапии, ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова» Минобороны России;

Черкашин Дмитрий Викторович, д.м.н., профессор, начальник кафедры военно-морской терапии, ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова» Минобороны России;

Улятовский Виктор Александрович, к.м.н., преподаватель кафедры военно-морской терапии, ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова» Минобороны России;

Шуленин Константин Сергеевич, д.м.н., профессор, заместитель начальника кафедры военно-морской терапии, ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова» Минобороны России;

Ефимов Семен Валерьевич, к.м.н., преподаватель кафедры военно-морской терапии, ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова» Минобороны России;

Мякошина Лилия Анатольевна, старший лаборант НИЦ, ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова» Минобороны России;

Буценко Сергей Алексеевич, начальник клинического отдела, ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова» Минобороны России.

**Authors information:**

Dmitry S. Bogdanov, adjunct of the Department of Naval Therapy, Military Medical Academy named after S. M. Kirov;

Dmitry V. Cherkashin, professor, doctor of medical sciences, Head of the Department of Naval Therapy, Military Medical Academy named after S. M. Kirov;

Viktor A. Ulyatovsky, candidate of medical sciences, lecturer at the Department of Naval Therapy, Military Medical Academy named after S. M. Kirov;

Konstantin S. Shulenin, professor, doctor of medical sciences, deputy Head of the Department of Naval Therapy, Military Medical Academy named after S. M. Kirov;

Semen V. Efimov, candidate of medical sciences, lecturer at the Department of Naval Therapy, Military Medical Academy named after S. M. Kirov;

Liliya A. Myakoshina, senior laboratory assistant of the Research Center, Military Medical Academy named after S. M. Kirov;

Sergey A. Butsenko, Head of the Clinical Department, Military Medical Academy named after S. M. Kirov.

## РЫБЫ *DANIO RERIO* КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ

Калинина О. В., Самбур Д. Б., Королева Е. Е., Головкин А. С.

Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Национальный медицинский исследовательский центр имени  
В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской  
Федерации, Санкт-Петербург, Россия

**Контактная информация:**

Калинина Ольга Викторовна,  
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»  
Минздрава России,  
ул. Аккурагова, д. 2, Санкт-Петербург,  
Россия, 197341.  
E-mail: olgakalinina@mail.ru

Статья поступила в редакцию 01.11.2023  
и принята к печати 24.11.2023.

### Резюме

На основании литературных данных была проведена оценка возможности использования рыб *Danio rerio* в качестве модели для изучения внеклеточных везикул (ВВ). В частности, описаны модельные эксперименты по оценке вклада ВВ в регуляцию патологических и физиологических процессов (ишемические, реперфузионные, механические повреждения тканей и органов, развитие местного и системного иммунного ответа, опухолевого роста и метастазирования и т. д.), биодоступности и распределения в тканях и органах введенных ВВ, эффектов экзогенных ВВ как терапевтических агентов.

**Ключевые слова:** внеклеточные везикулы, рыбы *Danio rerio*.

Для цитирования: Калинина О.В., Самбур Д.Б., Королева Е.Е., Головкин А.С. Рыбы *Danio rerio* как модель для изучения внеклеточных везикул. *Трансляционная медицина*. 2023;10(6):557-565. DOI: 10.18705/2311-4495-2023-10-6-557-565. EDN: NTFRNP

## ZEBRAFISH AS A MODEL FOR STUDING EXTRACELLULAR VESICLES

Olga V. Kalinina, Darina B. Sambur, Elizaveta E. Koroleva,  
Aleksey S. Golovkin

Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Olga V. Kalinina,  
Almazov National Medical Research Centre,  
Akkuratova str., 2, Saint Petersburg, Russia,  
197341.  
E-mail: olgakalinina@mail.ru

Received 1 November 2023; accepted  
24 November 2023.

### Abstract

It was evaluated the feasibility of using Zebrafish as a model to study extracellular vesicles (EVs) based on literature. Particularly, it was described experimental models that were used to assess the contribution of the EVs in the regulation of pathological and physiological processes (ischemic, reperfusion, mechanical damage to tissues and organs, development of local and systemic immune response, tumor growth and metastasis, etc.), the bioavailability and the distribution of injected EVs in different tissues and organs, the effects of exogenous EVs as therapeutic agents.

**Key words:** extracellular vesicles, zebrafish.

*For citation: Kalinina OV, Sambur DB, Koroleva EE, Golovkin AS. Zebrafish as a model for studing extracellular vesicles. Translyatsionnaya meditsina=Translational Medicine. 2023;10(6):557-565 (In Russ.) DOI: 10.18705/2311-4495-2023-10-6-557-565. EDN: NTFRNP*

**Список сокращений:** ВВ — внеклеточные везикулы, ВВок — внеклеточные везикулы, секретируемые опухолевыми клетками, ВВ\_Zmell — внеклеточные везикулы, производные клеточной линии меланомы, ГКС — гладкомышечные клетки сосудов, ГЭБ — гематоэнцефалический барьер, ЦНС — центральная нервная система, эВВэп — внеклеточные везикулы эндотелиального происхождения, CD — кластер дифференцировки, IL — интерлейкин, РМА — форбол-12-миристан-13-ацетат, TNF — фактор некроза опухолей.

### Введение

В последнее десятилетие рыбы *Danio rerio* стали широко использоваться в качестве модельного организма для изучения молекулярных механизмов развития и течения различных патофизиологических состояний, для оценки эффективности терапевтических агентов и поиска

новых терапевтических подходов. По сравнению с лабораторными млекопитающими животными, такими как крысы, мыши, кролики, рыбы обладают рядом преимуществ: высоким уровнем фертильности; большим количеством особей в потомстве (50–200); коротким периодом эмбриогенеза (большинство органов, включая нервную систему, сердечно-сосудистую систему, кишечник, печень и почки, дифференцируются и функционируют уже через 5 дней после оплодотворения); высоким содержанием белков (около 70 %) и генов-ортологов (около 47 %) с *Homo sapiens*; а также простотой и экономичностью в содержании и разведении [1]. Zebrafish обладают сходством органов и тканей на анатомическом, физиологическом и молекулярном уровнях с их аналогами у млекопитающих [2]. Так, сердце *Danio rerio* имеет предсердие и желудочек, в стенках присутствуют клетки, характерные для всех трех основных слоев эпикарда, миокарда и эндокарда сердца млекопитающих

[3]; головной мозг состоит из переднего, среднего и заднего мозга, подобно промежуточному мозгу, конечному мозгу и мозжечку млекопитающих, в нервной ткани обнаружены миелин и мотонейроны, микроглия, астроциты, олигодендроциты, клетки Пуркинье [4]; пронефрос состоит из двух нефронов, которые происходят из промежуточной мезодермы, подобно почкам млекопитающих, пронефральный проток выстлан эпителием от клубочка до клоаки и разделен на сегменты, сравнимые с мочевыделительной системой млекопитающих, такие как проксимальный и дистальный каналы [5]. *Danio rerio* обладают схожими реакциями иммунного ответа, функциональными эквивалентами В- и Т-лимфоцитов млекопитающих. Среди лейкоцитов популяции нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов характеризуются значительным морфологическим сходством с нейтрофилами и моноцитами млекопитающих соответственно [2]. Дополнительной особенностью *Danio rerio* является высокая скорость регенерации, делающая этот организм привлекательной модельной системой для изучения механизмов восстановления поврежденных тканей, в том числе элементов сердечно-сосудистой системы после моделирования инфаркта миокарда [3] и ишемического или механического повреждения центральной нервной системы [6].

Важное значение имеет оптическая прозрачность рыб *Danio rerio* в период эмбриогенеза и на ранних личиночных стадиях. Это свойство позволяет проводить визуальное наблюдение *in vivo* не только за ранними процессами развития и органогенеза, но также дает возможность отслеживать в органах и тканях траекторию, динамику распределения и поглощения различных флуоресцирующих препаратов, в том числе новых лекарственных молекул, антител и др. В свою очередь, облегчается возможность характеристики развития изменений в органах и тканях, обусловленных их введением [1, 7].

Внеклеточные везикулы (ВВ) — мембранные объекты, продуцируемые большинством видов клеток и имеющие размеры менее 1000 нм, способные осуществлять молекулярный транспорт через внеклеточное пространство, перенося многие биологически активные молекулы (белки, некодирующие регуляторные РНК, мРНК, ДНК, метаболиты и т. д.), тем самым участвуя в регуляции таких биологических процессов, как регенерация, онкогенез, ангиогенез, коагуляция, воспаление, иммунный ответ и др. [8].

Многие современные исследования направлены на верификацию терапевтического потенциала

внеклеточных везикул и возможности их диагностического использования, в частности при онкологических, нейродегенеративных, сердечно-сосудистых заболеваниях [9, 10]. Отдельное внимание уделяется изучению регенераторного потенциала ВВ при травматическом и ишемическом повреждении микроциркуляторного русла [11–19] тканей миокарда, печени, легких, кожного покрова, а также нервных клеток [20]. Представляют большой интерес такие свойства ВВ, как стимуляция пролиферации [21–23], угнетение воспаления [24–26] и снижение окислительного стресса [27]. Помимо этого, внеклеточные везикулы интересны в качестве способа доставки различных лекарственных веществ, особенно с учетом их способности преодолевать биологические барьеры [28]. ВВ универсальны, биodeградируемы, нетоксичны, эффективны при пассивном и активном нацеливании, обладают высокой внутренней стабильностью, за счет наличия на поверхности CD47 способны избегать мононуклеарной фагоцитарной системы [29]. Таргетное действие ВВ в значительной степени зависит от их поверхностного состава, обеспечивающего связывание с соответствующими рецепторами плазматической мембраны клеток-реципиентов. ВВ могут запускать как внешний, так и внутренний сигнальный каскад, высвобождая свой груз в цитоплазму [7].

**Цель обзора** — анализ использования модели *Danio rerio* для изучения патогенетического и терапевтического потенциала внеклеточных везикул различного клеточного происхождения на организменном уровне.

### 1. Модель *Danio rerio* для изучения вклада ВВ в регуляцию патологических процессов

В качестве модельного организма рыб *Danio rerio* используют на всех стадиях развития от эмбрионального до взрослой особи, скорость дифференцировки и онтогенеза личиночной стадии в совокупности с оптической прозрачностью позволяют оценивать патофизиологические процессы, протекающие в системах и органах начиная с 48 часов после оплодотворения. На протяжении десятилетий обширные исследования были посвящены функциональной роли различных популяций ВВ в системе *in vitro* или *in vivo* на моделях млекопитающих, тогда как создание трансгенных моделей *Danio rerio* открыло перспективы исследования в реальном времени биогенеза эндогенных ВВ *in vivo* и их участия в патофизиологических процессах, в том числе канцерогенезе.

С помощью методов визуализации в реальном времени на трансгенных моделях рыб с мем-

бранно-ассоциированной флуорофорной репортерной системой (Tg(Ola.Actb:Hsa.HRAS-EGFP, Tg(kdrl:mCherry-CAAX); Tg(mpeg1:EGFP)) были идентифицированы и отслежены траектории эндогенных ВВ, продуцируемых различными типами клеток, потенциально вовлеченных в патогенез сердечно-сосудистых заболеваний [30]. Использование трехдневных личинок *Danio rerio* трансгенной линии Tg(actb2:HRAS-EGFP), экспрессирующих GFP+ универсальный трансмембранный белок, позволило идентифицировать пул эндогенных внеклеточных везикул в периферическом кровотоке и перикардальном пространстве, в котором дополнительно оценивали подвижность GFP+ ВВ под влиянием сокращения сердца [30].

Эксперименты на личинках трансгенной линии Tg(kdrl:mCherry-CAAX), экспрессирующих флуоресцирующий эндотелиально-специфичный мембраносвязанный белок, доказали быстрое перемещение эндогенных ВВ эндотелиального происхождения (эВВЭп) в периферическом кровотоке, как в артериальном, так и в венозном русле. Моделирование общей гипоксии, как одного из компонентов ишемического повреждения, на этой трансгенной линии личинок показало значительное увеличение количества эВВЭп в периферическом кровотоке по сравнению с контрольной группой, что подтвердило динамические изменения биогенеза эндотелиальных ВВ при гипоксическом повреждении тканей. Изучение траектории движения эВВЭп на двойной трансгенной линии личинок Tg(kdrl:mCherry-CAAX) + Tg(mpeg1:EGFP), в которой дополнительно присутствовали GFP+ макрофаги, продемонстрировало способность последних захватывать эВВЭп из кровотока за счет выпячивания в просвет сосудов [30].

Эксперименты на взрослых особях комбинированных трансгенных линий *Danio rerio* позволили доказать межклеточную *in vivo* коммуникацию посредством эндогенных ВВ между кардиомиоцитами, эндотелиальными клетками и резидентными макрофагами внутри тканей сердца. Макрофаги усиленно поглощали ВВ как эндотелиального, так и кардиомиоцитарного происхождения. Эндотелиальные клетки активно взаимодействовали с ВВ из кардиомиоцитов, тогда как кардиомиоциты лишь незначительно захватывали эВВЭп [30].

Гладкомышечные клетки сосудов (ГКС) являются ключевыми участниками как ранней, так и поздней стадий атеросклероза, влияя на соседние клетки посредством биоактивных молекул, в том числе упакованных во внеклеточные везикулы [31]. В экспериментах на эмбриональной модели *Danio rerio* были получены доказательства

участия пропротеинконвертазы субтилизин/кексин типа 9 (PCSK9), секретируемой гладкомышечными клетками сосудов в составе ВВ, в патогенезе атеросклероза. PCSK9 является одним из основных регуляторов рецептора липопротеинов низкой плотности, экспрессируется в эндотелиальных клетках, макрофагах, гладкомышечных клетках сосудов, а также в атеросклеротических бляшках человека. Введение в проток Кювье двухдневным эмбрионам ВВ, продуцированных гладкомышечными клетками сосудов человека (A617 from human femoral artery), сверхэкспрессирующими PCSK9, приводило к увеличению экспрессии генов провоспалительных цитокинов *IL-1 $\beta$*  и *IL-8*. Более того, инъекция этих же препаратов ВВ в закрытую полость желудочка заднего мозга или внутримышечно приводила к миграции макрофагов в места инъекции, что подтверждало паракринное действие PCSK9 в составе ВВ [31].

Известно, что ВВ, секретируемые опухолевыми клетками (ВВок) и обогащенные проопухолевыми факторами (белки, факторы роста, некодирующие РНК и др.), играют важную роль в прогрессировании опухоли и метастазировании, в том числе участвуют в формировании преметастатических ниш и репрограммировании фенотипа стромальных клеток, обеспечивают перекрестную связь между клетками в микроокружении опухоли [32]. Изучение динамики биогенеза ВВок, их распределения между различными тканями и органами позволит создать новые терапевтические стратегии в лечении онкологических заболеваний. На эмбриональной модели *Danio rerio* была описана гемодинамика и внутрисосудистая локализация ВВ производных клеточной линии меланомы (BB\_Zmell), полученной из трансгенной модели *mitfa-BRAF(V600E); p53(-/-)* Zebrafish. Отмечена высокая скорость поглощения ВВ эндотелиальными клетками и циркулирующими в кровотоке макрофагами. Одновременно определена внутриклеточная локализация ВВ в поздних эндосомах [33]. Дополнительно установлено, что инъекция BB\_Zmell в кровотоки двухдневным эмбрионам рыб вызывала поляризацию макрофагов в направлении M1 через 20 часов с момента введения и также способствовала метастатическому росту и повышению инвазивности самих опухолевых клеток Zmell, введенных в эти же эмбрионы спустя 12 часов после инъекции BB\_Zmell [33].

Периодическая гипоксия или гипоксия с последующей реоксигенацией является распространенным явлением при солидных опухолях, включая нейробластомы, и влияет на результаты лечения. Гипоксия оказывается одним из стимулов секре-

ции ВВ клетками опухоли, а также способствует ее дедифференцировке в сторону более незрелого фенотипа и метастазированию [34]. В экспериментах *in vitro* было установлено, что гипоксия не влияет на состав поверхностных белковых маркеров, секретируемых ВВ клеток нейробластомы, но при этом обуславливает секрецию ВВ, способных стимулировать подвижность и инвазивность клеток нейробластомы, культивированных в условиях нормоксии. В то же время ВВ, секретируемые нейробластомой в нормоксических и гипоксических условиях, отличались по составу микроРНК, в частности по количеству miR-210-3p. На двухдневной эмбриональной модели *Danio rerio* показали, что только опухолевые клетки, предварительно инкубированные с ВВ, секретированные под действием гипоксии и обогащенные miR-210-3p, после инъекции в желточный мешок были способны быстро проникать в кровоток, мигрировать в область каудального сплетения и транслоцироваться в аваскулярную каудальную область хвоста [34]. Данное исследование позволило продемонстрировать *in vivo* вклад ВВ в процесс диссеминации опухолевых клеток и метастазирования.

В модельных экспериментах с рыбами *Danio rerio* установлено, что ВВ способны влиять на функциональную активность нейронов, на поддержание миелинизации, оказывать нейропротекторное действие, а также опосредовать нейровоспалительные реакции, тем самым влияя на развитие и течение нейровоспалительных и нейродегенеративных заболеваний [10, 35]. Было проведено изучение механизмов, лежащих в основе секреции ВВ нейронами и их действия на сосудистую систему ЦНС. На модели *vps28* мутантной трансгенной линии Tg (Kdrl: eGFP; Gatal: DsRed) была показана ключевая роль белка Vps28 (vacuolar protein sorting 28), экспрессируемого нейронами, в развитии васкуляризации головного мозга и целостности гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) за счет влияния на формирование нейронами мультивезикулярных телец. Полученные результаты свидетельствовали о том, что белок Vps28 действует как регулятор секреции нейрональных ВВ, которые, в свою очередь, связываются с эндотелиальными клетками, опосредуя ангиогенез путем транспортировки фактора роста эндотелия сосудов (VEGF-A) [36].

## 2. Модель *Danio rerio* для изучения влияния ВВ на поляризацию иммунного ответа и процессы регенерации

На основе анализа транскриптома 23 207 генов было показано, что иммунные сигнальные пути

и экспрессия отдельных генов у *Danio rerio* и млекопитающих эволюционно консервативны [37]. После интрацеломического введения взрослым рыбам липополисахарида транскриптомный ответ в тканях печени, почек и мышцах на воспалительный стимул затрагивал в первую очередь гены, связанные с обнаружением, процессингом и передачей сигналов в ответ на внешние антигены, иммунные сигнальные пути и апоптоз [37]. Схожее исследование продемонстрировало возможность моделирования системного воспалительного ответа у рыб *Danio rerio* посредством инъекции липополисахарида [38].

На основе анализа транскриптома единичных клеток была выявлена гетерогенность макрофагов и дендритных клеток у взрослых рыб *Danio rerio* в зависимости от их локализации в барьерных тканях, печени и сердце [39]. Идентифицированы два типа макрофагов: провоспалительные макрофаги с потенциалом для фагоцитоза и альтернативно активированные макрофаги с потенциалом для регенерации тканей. Кроме того, охарактеризованы популяции обычных дендритных клеток с выраженной способностью к презентации антигена и популяция плазматоцитидных дендритных клеток, обладающих антивирусными свойствами [39]. Эти исследования позволяют рассматривать *Danio rerio* в качестве ценной модели для *in vivo* изучения заболеваний, ассоциированных с воспалением.

В нашем исследовании на модели взрослых рыб было установлено, что введение в целомическую полость рыб ВВ, секретируемых моноцитоподобными клетками ТНР-1 без стимуляции и после активации фактором некроза опухолей (TNF) или форбол-12-миристан-13-ацетатом (PMA), вызывает изменение экспрессии генов про- и противовоспалительных цитокинов в головном мозге, печени и сердце рыб [40]. Более того, в зависимости от вида и дозы стимула, который применялся для получения фракций ВВ, менялась сила и направленность регистрируемых эффектов, что, в свою очередь, указывало на изменение качественного состава продуцируемых ВВ и свидетельствовало об их возможном влиянии на поляризацию иммунного ответа.

Исследование на эмбриональной модели *Danio rerio* подтвердило гипотезу о том, что ВВ, секретируемые клеточными линиями колоректального рака при активации в них генов эндогенных ретровирусов (HERV+ВВ), участвуют в модуляции врожденного иммунного ответа, являющегося ключевым этапом при формировании метастатической ниши [41]. В геноме человека около 8,5 %

генов представлено генами эндогенных ретровирусов (HERV), которые участвуют в ряде физиологических процессов, таких как слияние трофобластов во время развития плаценты и модуляция иммунного ответа; в то же время они могут быть вовлечены в развитие канцерогенеза, в частности колоректального рака. В ходе эксперимента инъекция HERV+BB, продуцируемых неметастатической линией колоректального рака Caco-2 или метастатической линией SK-CO-1, в проток Кювье двухдневным эмбрионам обуславливала изменение уровня экспрессии генов провоспалительного *IL-1 $\beta$* , противовоспалительного *IL-10* и маркера активации нейтрофилов *mpx*, что свидетельствовало о роли HERV+BB в качестве иммуномодуляторов [41].

В настоящее время тестируются многочисленные стратегии лечения различных заболеваний сетчатки, включая подходы генной терапии и трансплантацию стволовых клеток. В качестве альтернативных методов рассматривают индукцию эндогенной регенерации, обусловленной резидентными плюрипотентными стволовыми клетками сетчатки взрослого человека (глия Мюллера) [42]. На модели взрослой Zebrafish был проведен скрининг BB, полученных из различных культур клеток, в том числе стволовых клеток, первичных нейрональных клеток, индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, различных опухолевых линий, а также клеток сетчатки рыб дикого типа. Оценивали их способность индуцировать пролиферативный ответ после интравитреальной инъекции в неповрежденную сетчатку. Сетчатка взрослой особи *Danio rerio* содержит клетки, которые могут восстанавливать все поврежденные типы клеток сетчатки. Оказалось, что наибольшим регенераторным потенциалом обладали BB, продуцируемые клетками С6 глиомы, однако протеомный анализ не выявил значительного обогащения BB ни одним из наиболее изученных белков, участвующих в регенерации сетчатки [42].

### 3. Модель *Danio rerio* для изучения BB как способа таргетной доставки различных препаратов

Внеклеточные везикулы все чаще рассматриваются в качестве средств доставки биоактивных молекул посредством внутрисосудистого введения, что предусматривает эффективность их поглощения эндотелиальными клетками, которые выстилают внутреннюю поверхность кровеносных сосудов [7]. На трансгенной модели *Danio rerio* (Tg(flk:gfp endothelial-specific transgenic fish)) было изучено влияние гемодинамики на поглощение эндотелиальными клетками сосудов BB эритроцитарного

происхождения, которые способны длительно циркулировать в кровотоке по сравнению с другими BB [43]. Для этого в сердце двухдневных личинок вводили меченные DiD (1,19-Dioctadecyl-3,3,39,39-tetramethylindodicarbocyanine perchlorate) BB эритроцитарного происхождения и отслеживали их интернализацию в течение 12 часов с помощью лазерной конфокальной микроскопии в реальном времени в хвосте рыб, так как было установлено, что хвостовая артерия и задняя кардинальная вена у личинок рыб имеют разные скорости кровотока, а эндотелиальное напряжение сдвига пропорционально вязкости крови. Было установлено, что BB в основном поглощались эндотелиальными клетками задней кардинальной вены через 3 часа с момента инъекции и продолжали там же накапливаться в течение последующих 12 часов, что позволило сделать заключение о влиянии низкой скорости кровотока, обусловленной снижением напряжения на стенки сосудов и изменением пульсовой волны, на увеличение эффективности поглощения BB эндотелиальными клетками [43]. Полученные результаты открывают перспективы для дальнейшего использования модели *Danio rerio* для изучения основ биомеханического поглощения BB различными клетками и органами, в частности, для разработки терапевтических стратегий при сердечно-сосудистых заболеваниях.

Существенным ограничением для терапевтических препаратов является гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). На модели трансгенных эмбрионов TG (fli1: GFP) рыбы с моделированием глиобластомы-астроцитомы головного мозга U-87 MG (brain neuronal glioblastoma-astrocytoma U-87 MG), меченных Brite® DiD, было доказано, что с помощью экзосом, продуцированных эндотелиальными клетками головного мозга, можно доставлять противоопухолевые препараты через ГЭБ [44]. Препараты экзосом, полученные из четырех клеточных линий глиобластомы-астроцитомы нейронов головного мозга U-87 MG (brain neuronal glioblastoma-astrocytoma U-87 MG); эндотелия (endothelial bEND.3), нейроэктодермальной опухоли (neuroectodermal tumor PFSK-1) и глиобластомы (glioblastoma A-172), были нагружены родамином 123 и введены в общую кардинальную вену пятидневным трансгенным эмбрионам TG (fli1: GFP). Через 18 часов после инъекции родамин 123 был детектирован в тканях головного мозга только при использовании в качестве средства доставки экзосом, производных эндотелиальных клеток головного мозга, которые экспрессировали больше трансмембранных белков тетраспанинов CD63 по сравнению с экзосомами, произво-

дными опухолевыми клеточными линиями U-87 MG, PFSK-1, A-172. Также эндотелиальные экзосомы bEND.3 эффективно доставляли другие противоопухолевые препараты, такие как доxorубин (doxorubicin) и паклитаксел (paclitaxel) в ткани головного мозга. Данные эксперименты *in vivo* позволили доказать возможность использования экзосом эндотелиального происхождения для эффективной доставки груза через ГЭБ [44].

Таким образом, *Danio rerio* обладает всеми необходимыми характеристиками для изучения биологических процессов *in vivo*, оценки патофизиологического и терапевтического потенциала внеклеточных везикул на организменном уровне.

### Заключение

Вышеописанные эксперименты открывают новые возможности использования рыб *Danio rerio* для изучения тонких механизмов клеточной коммуникации, опосредованной внеклеточными везикулами *in vivo* в норме и при патологии. В частности, молекулярных основ клеточной миграции и формирования преметастатических ниш, поляризации иммунного ответа, биодоступности и распределения в тканях препаратов внеклеточных везикул.

### Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

### Финансирование / Funding

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 19-75-20076, <https://rscf.ru/project/19-75-20076/> / The research was carried out at the expense of a grant from the Russian Science Foundation No. 19-75-20076, <https://rscf.ru/project/19-75-20076/>

### Список литературы / References

1. Piña B, Navarro L, Barata C, et al. Omics in zebrafish teratogenesis. In: *Methods in Molecular Biology*. 2018. p. 421–41. DOI: 10.1007/978-1-4939-7883-0\_23.
2. Menke AL, Spitsbergen JM, Wolterbeek APM, Woutersen RA. Normal anatomy and histology of the adult zebrafish. *Toxicol Pathol*. 2011;39(5):759–75. DOI: 10.1177/0192623311409597.
3. Hu B, Lelek S, Spanjaard B, et al. Origin and function of activated fibroblast states during zebrafish heart regeneration. *Nat Genet*. 2022 Aug;54(8):1227–37. DOI: 10.1038/s41588-022-01129-5.
4. Saleem S, Kannan RR. Zebrafish: an emerging real-time model system to study Alzheimer's disease and

neurospecific drug discovery. *Cell Death Discov*. 2018 Oct;4(1):45. DOI: 10.1038/s41420-018-0109-7.

5. Outtandy P, Russell C, Kleta R, Bockenbauer D. Zebrafish as a model for kidney function and disease. *Pediatr Nephrol*. 2019 May;34(5):751–62. DOI: 10.1007/s00467-018-3921-7.

6. Herzog C, Greenald D, Larraz J, et al. RNA-seq analysis and compound screening highlight multiple signalling pathways regulating secondary cell death after acute CNS injury *in vivo*. *Biol Open*. 2020 May;9(5). DOI: 10.1242/bio.050260.

7. Androuin A, Verweij FJ, van Niel G. Zebrafish as a preclinical model for Extracellular Vesicle-based therapeutic development. *Adv Drug Deliv Rev*. 2021;176:113815. DOI: 10.1016/j.addr.2021.05.025.

8. Yuana Y, Sturk A, Nieuwland R. Extracellular vesicles in physiological and pathological conditions. *Blood Rev*. 2013;27(1):31–9. DOI: 10.1016/j.blre.2012.12.002.

9. Serrati S, Guida M, Di Fonte R, et al. Circulating extracellular vesicles expressing PD1 and PD-L1 predict response and mediate resistance to checkpoint inhibitors immunotherapy in metastatic melanoma. *Mol Cancer*. 2022 Jan;21(1):20. DOI: 10.1186/s12943-021-01490-9.

10. Ruan J, Miao X, Schlüter D, et al. Extracellular vesicles in neuroinflammation: Pathogenesis, diagnosis, and therapy. *Mol Ther*. 2021 Jun;29(6):1946–57. DOI: 10.1016/j.ymthe.2021.04.020.

11. El Harane N, Kervadec A, Bellamy V, et al. Acellular therapeutic approach for heart failure: In vitro production of extracellular vesicles from human cardiovascular progenitors. *Eur Heart J*. 2018;39(20):1835–47. DOI: 10.1093/eurheartj/ehy012.

12. Ma J, Zhao Y, Sun L, et al. Exosomes Derived from Akt -Modified Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Improve Cardiac Regeneration and Promote Angiogenesis via Activating Platelet-Derived Growth Factor D. *Stem Cells Transl Med*. 2017;6(1):51–9. DOI: 10.5966/sctm.2016-0038.

13. Zhu LP, Tian T, Wang JY, et al. Hypoxia-elicited mesenchymal stem cell-derived exosomes facilitates cardiac repair through miR-125b-mediated prevention of cell death in myocardial infarction. *Theranostics*. 2018;8(22):6163–77. DOI: 10.7150/thno.28021.

14. Deng S, Zhou X, Ge Z, et al. Exosomes from adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorate cardiac damage after myocardial infarction by activating S1P/SK1/S1PR1 signaling and promoting macrophage M2 polarization. *Int J Biochem Cell Biol*. 2019;114(May):105564. DOI: 10.1016/j.biocel.2019.105564.

15. Eguchi S, Takefuji M, Sakaguchi T, et al. Cardiomyocytes capture stem cell-derived, anti-apoptotic microRNA-214 via clathrin-mediated endocytosis in acute myocardial infarction. *J Biol Chem*. 2019;294(31):11665–74. DOI: 10.1074/jbc.RA119.007537.

16. Ni J, Liu X, Yin Y, et al. Exosomes derived from TIMP2-modified human umbilical cord mesenchymal stem cells enhance the repair effect in rat model with myocardial infarction possibly by the Akt/ SFRP2 pathway. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019. DOI: 10.1155/2019/1958941.
17. Zhao J, Li X, Hu J, et al. Mesenchymal stromal cell-derived exosomes attenuate myocardial ischaemia-reperfusion injury through miR-182-regulated macrophage polarization. *Cardiovasc Res*. 2019 Jun;115(7):1205–16. DOI: 10.1093/cvr/cvz040.
18. Sun XH, Wang X, Zhang Y, Hui J. Exosomes of bone-marrow stromal cells inhibit cardiomyocyte apoptosis under ischemic and hypoxic conditions via miR-486-5p targeting the PTEN/PI3K/AKT signaling pathway. *Thromb Res*. 2019;177:23–32. DOI: 10.1016/j.thromres.2019.02.002.
19. Bian B, Zhao C, He X, et al. Exosomes derived from neural progenitor cells preserve photoreceptors during retinal degeneration by inactivating microglia. *J Extracell Vesicles*. 2020;9(1). DOI: 10.1080/20013078.2020.1748931.
20. Song Y, Li Z, He T, et al. M2 microglia-derived exosomes protect the mouse brain from ischemia-reperfusion injury via exosomal miR-124. *Theranostics*. 2019;9(10):2910–23. DOI: 10.7150/thno.30879.
21. Wang D, Gao B, Yue J, et al. Exosomes from mesenchymal stem cells expressing miR-125b inhibit neointimal hyperplasia via myosin IE. *J Cell Mol Med*. 2019 Feb;23(2):1528–40. DOI: 10.1111/jcmm.14060.
22. Qu Q, Pang Y, Zhang C, et al. Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells inhibit vein graft intimal hyperplasia and accelerate reendothelialization by enhancing endothelial function. *Stem Cell Res Ther*. 2020;11(1):1–14. DOI: 10.1186/s13287-020-01639-1.
23. Willis GR, Fernandez-Gonzalez A, Anastas J, et al. Mesenchymal stromal cell exosomes ameliorate experimental bronchopulmonary dysplasia and restore lung function through macrophage immunomodulation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2018;197(1):104–16. DOI: 10.1164/rccm.201705-0925OC.
24. Woo CH, Kim HK, Jung GY, et al. Small extracellular vesicles from human adipose-derived stem cells attenuate cartilage degeneration. *J Extracell Vesicles*. 2020;9(1). DOI: 10.1080/20013078.2020.1735249.
25. Zhu D, Tian J, Wu X, et al. G-MDSC-derived exosomes attenuate collagen-induced arthritis by impairing Th1 and Th17 cell responses. *Biochim Biophys Acta — Mol Basis Dis*. 2019 Dec;1865(12):165540. DOI: 10.1016/j.bbdis.2019.165540.
26. Chen L, Huang H, Zhang W, et al. Exosomes derived from T regulatory cells suppress CD8+ cytotoxic T lymphocyte proliferation and prolong liver allograft survival. *Med Sci Monit*. 2019;25:4877–84. DOI: 10.12659/MSM.917058.
27. Zhou Y, Xu H, Xu W, et al. Exosomes released by human umbilical cord mesenchymal stem cells protect against cisplatin-induced renal oxidative stress and apoptosis in vivo and in vitro. *Stem Cell Res Ther*. 2013 Apr;4(2):34. DOI: 10.1186/scrt194.
28. Elsharkasy OM, Nordin JZ, Hagey DW, et al. Extracellular vesicles as drug delivery systems: Why and how? *Adv Drug Deliv Rev*. 2020;159:332–43. DOI: 10.1016/j.addr.2020.04.004.
29. De Jong OG, Kooijmans SAA, Murphy DE, et al. Drug Delivery with Extracellular Vesicles: From Imagination to Innovation. *Acc Chem Res*. 2019;52(7):1761–70. DOI: 10.1021/acs.accounts.9b00109.
30. Scott A, Sueiro Ballesteros L, Bradshaw M, et al. In Vivo Characterization of Endogenous Cardiovascular Extracellular Vesicles in Larval and Adult Zebrafish. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2021;41(9):2454–68. DOI: 10.1161/ATVBAHA.121.316539.
31. Greco MF, Rizzuto AS, Zarà M, et al. PCSK9 Confers Inflammatory Properties to Extracellular Vesicles Released by Vascular Smooth Muscle Cells. *Int J Mol Sci*. 2022 Oct;23(21):13065. DOI: 10.3390/ijms232113065.
32. Hyenne V, Lefebvre O, Goetz JG. Going live with tumor exosomes and microvesicles. *Cell Adhes Migr*. 2017 Mar;11(2):173–86. DOI: 10.1080/19336918.2016.1276694.
33. Hyenne V, Ghoroghi S, Collot M, et al. Studying the Fate of Tumor Extracellular Vesicles at High Spatiotemporal Resolution Using the Zebrafish Embryo. *Dev Cell*. 2019;48(4):554–572.e7. DOI: 10.1016/j.devcel.2019.01.014.
34. Fusco P, Fietta A, Esposito MR, et al. miR-210-3p enriched extracellular vesicles from hypoxic neuroblastoma cells stimulate migration and invasion of target cells. *Cell Biosci*. 2023 May;13(1):89. DOI: 10.1186/s13578-023-01045-z.
35. Jin T, Gu J, Li Z, et al. Recent advances on extracellular vesicles in central nervous system diseases. *Clin Interv Aging*. 2021 Feb;16:257–74. DOI: 10.2147/CIA.S288415.
36. Dong X, Jiang D, Wang L, et al. VPS28 regulates brain vasculature by controlling neuronal VEGF trafficking through extracellular vesicle secretion. *iScience*. 2022 Apr;25(4):104042. DOI: 10.1016/j.isci.2022.104042.
37. Forn-Cuní G, Varela M, Pereiro P, et al. Conserved gene regulation during acute inflammation between zebrafish and mammals. *Sci Rep*. 2017;7(February 2016):41905. DOI: 10.1038/srep41905.
38. Ma Y, Fedorov AV, Kondratov KA, et al. Organ-specific LPS-induced inflammatory gene expression in adult Zebrafish. *Med Immunol*. 2021 Nov;23(5):1069–78. DOI: 10.15789/1563-0625-OSL-2357.
39. Zhou Q, Zhao C, Yang Z, et al. Cross-organ single-cell transcriptome profiling reveals macrophage and dendritic cell heterogeneity in zebrafish. *Cell Rep*. 2023 Jul;42(7):112793. DOI: 10.1016/j.celrep.2023.112793.
40. Sambur DB, Kalinina OV, Aquino AD, et al. Extracellular vesicles secreted by activated THP-1 cells

influence the expression of inflammation-related genes in *Danio rerio* organs. *Neurochemistry*. 2024;1. In Russian [Самбур Д.Б., Калинина О.В., Акино А.Д. и др. Внеклеточные везикулы, секретируемые активированными клетками ТНР-1, влияют на экспрессию генов воспаления в органах *Danio rerio*. *Нейрохимия*. 2024;1].

41. Ferrari L, Cafora M, Rota F, et al. Extracellular vesicles released by colorectal cancer cell lines modulate innate immune response in zebrafish model: The possible role of human endogenous retroviruses. *Int J Mol Sci*. 2019 Jul;20(15):3669. DOI: 10.3390/ijms20153669.

42. Didiano D, Abner JJ, Hinger SA, et al. Induction of a proliferative response in the zebrafish retina by injection of extracellular vesicles. *Exp Eye Res*. 2020 Nov;200(3):108254. DOI: 10.1016/j.exer.2020.108254.

43. Qin X, Zhang K, Qiu J, et al. Uptake of oxidative stress-mediated extracellular vesicles by vascular endothelial cells under low magnitude shear stress. *Bioact Mater*. 2022 Mar;9:397–410. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2021.10.038.

44. Yang T, Martin P, Fogarty B, et al. Exosome delivered anticancer drugs across the blood-brain barrier for brain cancer therapy in *Danio Rerio*. *Pharm Res*. 2015 Jun;32(6):2003–14. DOI: 10.1007/s11095-014-1593-y.

#### Информация об авторах:

Калинина Ольга Викторовна, д.б.н., доцент, ведущий научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории аутоиммунных и аутовоспалительных заболеваний научно-исследовательского центра неизвестных, редких и генетически обусловленных заболеваний НЦМУ «Центр персонализированной медицины», профессор кафедры лабораторной медицины и генетики Института медицинского образования ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Самбур Дарина Борисовна, клинический ординатор кафедры лабораторной медицины и генетики Института медицинского образования ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, лаборант-исследователь научно-исследовательской лаборатории аутоиммунных и аутовоспалительных заболеваний научно-исследовательского центра неизвестных, редких и генетически обусловленных заболеваний НЦМУ «Центр персонализированной медицины»;

Королева Елизавета Евгеньевна, лаборант-исследователь Института молекулярной биологии и генетики ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Головкин Алексей Сергеевич, д.м.н., руководитель группы генно-клеточной инженерии Института молекулярной биологии и генетики ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, ведущий научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории аутоиммунных и аутовоспалительных заболеваний научно-исследовательского центра неизвестных, редких и генетически обусловленных заболеваний НЦМУ «Центр

персонализированной медицины», профессор кафедры клеточной биологии и гистологии Института медицинского образования ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России.

#### Authors information:

Olga V. Kalinina, Doctor of Medicine, Associate Professor, Leading Researcher at the Research Laboratory of Autoimmune and Autoinflammatory Diseases, Research Center of Unknown, Rare and Genetically Determined Diseases of the World-Class Research Center for Personalized Medicine; Professor at the Department of Laboratory Medicine and Genetics, Institute of Medical Education of the Almazov National Medical Research Centre;

Darina B. Sambur, clinical resident of the Department of Laboratory Medicine and Genetics, Institute of Medical Education of the Almazov National Medical Research Centre; research laboratory assistant at the Research Laboratory of Autoimmune and Autoinflammatory Diseases, Research Center of Unknown, Rare and Genetically Determined Diseases of the World-Class Research Center for Personalized Medicine;

Elizaveta E. Koroleva, research laboratory assistant at the Institute of Molecular Biology and Genetics of the Almazov National Medical Research Centre;

Aleksey S. Golovkin, Doctor of Medicine, Head of the Group of Genetic Cell Engineering, Institute of Molecular Biology and Genetics of the Almazov National Medical Research Centre; Leading Researcher at the Research Laboratory of Autoimmune and Autoinflammatory Diseases, Research Center of Unknown, Rare and Genetically Determined Diseases of the World-Class Research Center for Personalized Medicine; Professor at the Department of Cell Biology and Histology, Institute of Medical Education of the Almazov National Medical Research Centre.

## РОЛЬ НЕЙРОВосПАЛЕНИЯ В ПАТОГЕНЕЗЕ ОТЕКА ГОЛОВНОГО МОЗГА И ГЕМОРАГИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ПРИ ИШЕМИЧЕСКОМ ИНСУЛЬТЕ: МЕХАНИЗМЫ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ МИШЕНИ

Шиленко Л. А.<sup>1,2</sup>, Карпов А. А.<sup>1,4</sup>, Веретенникова Е. И.<sup>3</sup>,  
Галагудза М. М.<sup>1,2</sup>

### Контактная информация:

Шиленко Леонид Алексеевич,  
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»  
Минздрава России,  
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,  
Россия, 197341.  
E-mail: shilenko.leo@yandex.ru

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Национальный медицинский исследовательский центр имени  
В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской  
Федерации, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное  
учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский  
государственный медицинский университет имени академика  
И. П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской  
Федерации, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное  
учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский  
государственный педиатрический медицинский университет»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации,  
Санкт-Петербург, Россия

<sup>4</sup> Федеральное государственное автономное образовательное  
учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский  
государственный электротехнический университет «ЛЭТИ»  
им. В. И. Ульянова (Ленина)» Санкт-Петербург, Россия

*Статья поступила в редакцию 17.05.2023  
и принята к печати 21.08.2023.*

### Резюме

Острое нарушение мозгового кровообращения является одной из ведущих причин инвалидизации и смертности во всем мире. Учитывая значительное увеличение продолжительности жизни населения, инсульт в ближайшие несколько десятилетий будет оставаться серьезной медико-социальной проблемой. Среди различных причин инсульта преобладает ишемическое повреждение головного мозга. В основе ишемического инсульта лежит снижение интенсивности кровоснабжения тканей головного мозга, в результате которого уменьшается доставка к нейронам необходимого количества глюкозы и кислорода, которые требуются для обеспечения нормальной функции этого органа. В то же время во многих случаях спонтанное либо медикаментозное восстановление кровотока после периода ишемии сопровождается парадоксальным нарастанием повреждения, в связи с чем процесс повреждения ткани головного мозга при нарушениях кровообращения целесообразно рассматривать в контексте ишемического-реперфузионного повреждения (ИРП). Одним из ключевых механизмов ИРП головного мозга является воспалительная реакция. В процессе вторичного иммунного повреждения головного мозга принимают участие как механизмы врожденного иммунитета, проявляющиеся лейкоцитарной инфильтрацией поврежденного участка головного мозга, так и антиген-зависимые реакции адаптивного иммунитета. Одним из

важнейших проявлений нейровоспаления при ИРП головного мозга является повышение транс- и парацеллюлярной проницаемости гематоэнцефалического барьера, которое лежит в основе развития вазогенного отека головного мозга и геморрагической трансформации очага. В настоящем обзоре рассмотрены современные представления о молекулярных механизмах, связывающих асептическое воспаление, отек и геморрагическую трансформацию.

**Ключевые слова:** головной мозг, ишемический инсульт, ишемическое-реперфузионное повреждение, нейровоспаление.

*Для цитирования:* Шиленко Л.А., Карпов А.А., Веретенникова Е.И., Галагудза М.М. Роль нейровоспаления в патогенезе отека головного мозга и геморрагической трансформации при ишемическом инсульте: механизмы и терапевтические мишени. *Трансляционная медицина.* 2023;10(6):566-580. DOI: 10.18705/2311-4495-2023-10-6-566-580. EDN: NYMEXY

## THE ROLE OF NEURO-INFLAMMATORY IN THE PATHOGENESIS OF BRAIN EDEMA AND HEMORRHAGIC TRANSFORMATION IN ISCHEMIC STROKE: MECHANISMS AND THERAPEUTIC TARGETS

Leonid A. Shilenko<sup>1,2</sup>, Andrei A. Karpov<sup>1,4</sup>,  
Elizaveta I. Veretennikova<sup>3</sup>, Michael M. Galagudza<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

<sup>2</sup> Academician I. P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint Petersburg, Russia

<sup>3</sup> Saint Petersburg State Pediatric Medical University, Saint Petersburg, Russia

<sup>4</sup> Saint Petersburg Electrotechnical University "LETI", Saint Petersburg, Russia

**Corresponding author:**

Leonid A. Shilenko,  
Almazov National Medical Research Centre,  
Akkuratova str., 2, Saint Petersburg, Russia,  
197341.

E-mail: shilenko.leo@yandex.ru

Received 17 May 2023; accepted 21 August 2023.

### Abstract

Acute cerebrovascular accident is one of the leading causes of disability and death worldwide. Given the significant increase in life expectancy of the population, stroke will remain a serious medical and social problem in the next few decades. Among the various causes of stroke, ischemic brain damage predominates. Ischemic stroke is based on a decrease in the intensity of blood supply to the brain tissues, as a result of which there is a decrease in the delivery to neurons of the required amount of glucose and oxygen, which are required to ensure the normal function of this organ. At the same time, in many cases, spontaneous or medical restoration of blood flow after a period of ischemia is accompanied by a paradoxical increase in damage, and therefore it is advisable to consider the process of damage to brain tissue during circulatory disorders in the context of ischemic-reperfusion injury (IRI). One of the key mechanisms of brain IRI is the inflammatory response. In the process of secondary immune damage to the brain, both mechanisms of innate immunity, manifested by leukocyte infiltration of the damaged brain area, and antigen-dependent reactions of adaptive immunity are involved. One of the most important manifestations of neuroinflammation in cerebral IRI is an increase in trans- and paracellular permeability of the blood-brain barrier, which underlies the development of vasogenic cerebral edema and hemorrhagic transformation of the focus. This review considers current ideas about the molecular mechanisms that link aseptic inflammation, edema, and hemorrhagic transformation.

**Key words:** brain, ischemia-reperfusion injury, ischemic stroke, neuroinflammation.

*For citation: Shilenko LA, Karpov AA, Veretennikova EI, Galagudza MM. The role of neuro-inflammation in the pathogenesis of brain edema and hemorrhagic transformation in ischemic stroke: mechanisms and therapeutic targets. Translyatsionnaya meditsina=Translational Medicine. 2023;10(6):566-580 (In Russ.) DOI: 10.18705/2311-4495-2023-10-6-566-580. EDN: NYMEXY*

**Список сокращений:** АПК — антиген-презентирующие клетки, АТФ — аденозинтрифосфат, АФК — активные формы кислорода, ГМ — головной мозг, ГТ — геморрагическая трансформация, ГЭБ — гематоэнцефалический барьер, ИЛ — интерлейкин, ИРП — ишемическое-реперфузионное повреждение, ММП — матриксные металлопротеиназы, НВЛ — нейтрофильные внеклеточные ловушки, АР-1 — активаторный белок-1, EAAT1 — транспортер возбуждающих аминокислот 1, HMGBl — белок высокомолекулярной группы белков бокс-1, МНС II — главный комплекс гистосовместимости II класса, NFκB — ядерный транскрипционный фактор κB, NKCC1 — трансмембранные ионные котранспортеры катионов и хлора, TNF-α — фактор некроза опухоли-альфа, tPA — тканевой активатор плазминогена, VEGF — сосудистый эндотелиальный фактор роста.

### Введение

Нарушение мозгового кровообращения — одна из ведущих причин инвалидизации и смертности во всем мире. В связи со значительным увеличением продолжительности жизни населения и изменяющейся демографической ситуацией инсульт будет оставаться серьезной медико-социальной проблемой в течение ближайших 30 лет. Среди различных причин инсульта преобладает ишемическое повреждение головного мозга (ГМ). Доля ишемических инсультов составляет 87 % от общего числа инсультов, тогда как 10 % составляют геморрагические инсульты и около 3 % — инсульты, связанные с кровоизлиянием в субарахноидальное пространство. Согласно современным представлениям, ишемический инсульт — это снижение интенсивности кровоснабжения тканей ГМ, в результате которого уменьшается доставка к нейронам необходимого количества глюкозы и кислорода, которые требуются для обеспечения нормальной функции ГМ. Применение тромболитической терапии кардинальным образом улучшило прогноз у пациентов с атеротромбозом мозговых артерий. В то же время во многих случаях спонтанное либо медикаментозное восстановление кровотока после периода ишемии сопровождается парадоксальным

нарастанием повреждения, в связи с чем процесс повреждения ткани ГМ при нарушениях кровообращения целесообразно рассматривать в контексте ишемического-реперфузионного повреждения (ИРП). Одним из ключевых механизмов ИРП ГМ является воспалительная реакция, индуцированная повреждением клеток ГМ. Воспаление и активация иммунной системы посредством различных механизмов приводят к повышению проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), которое, в свою очередь, является основным патогенетическим фактором при развитии таких грозных осложнений ишемического инсульта, как вазогенный отек ГМ и геморрагическая трансформация (ГТ) очага. В настоящем обзоре рассмотрены современные представления о молекулярных механизмах, связывающих асептическое воспаление, отек и ГТ.

### Воспаление и иммунный ответ при ишемии головного мозга

Фокальная ишемия ГМ, вызывающая необратимое повреждение нервной ткани, всегда сопровождается выраженным воспалительным ответом. Начальные признаки асептического воспаления при ишемическом инсульте в виде усиления адгезии нейтрофилов к эндотелию микрососудов в зоне повреждения регистрируются в эксперименте через 1–2 часа после начала ишемии [1], тогда как в целом процесс воспаления продолжается до 2–3 недель. При этом последние данные показывают, что нейровоспаление после инсульта может быть значительно более продолжительным [2]. Таким образом, процессы нейровоспаления захватывают центральную и заключительную части ишемического каскада, причем более ранние проявления острого воспаления рассматриваются преимущественно в контексте вторичного повреждения ткани ГМ и расширения зоны инфаркта, тогда как отсроченное воспаление имеет более благоприятную роль, способствуя репарации ткани ГМ [3]. Поскольку воспаление представляет собой реакцию иммунной системы организма на повреждение собственных клеток, целесообразно рассматривать данный процесс как последовательную активацию врожденного, а затем адаптивного иммунитета.

В обоих случаях имеют место как локальные, так и системные проявления, рассмотренные ниже.

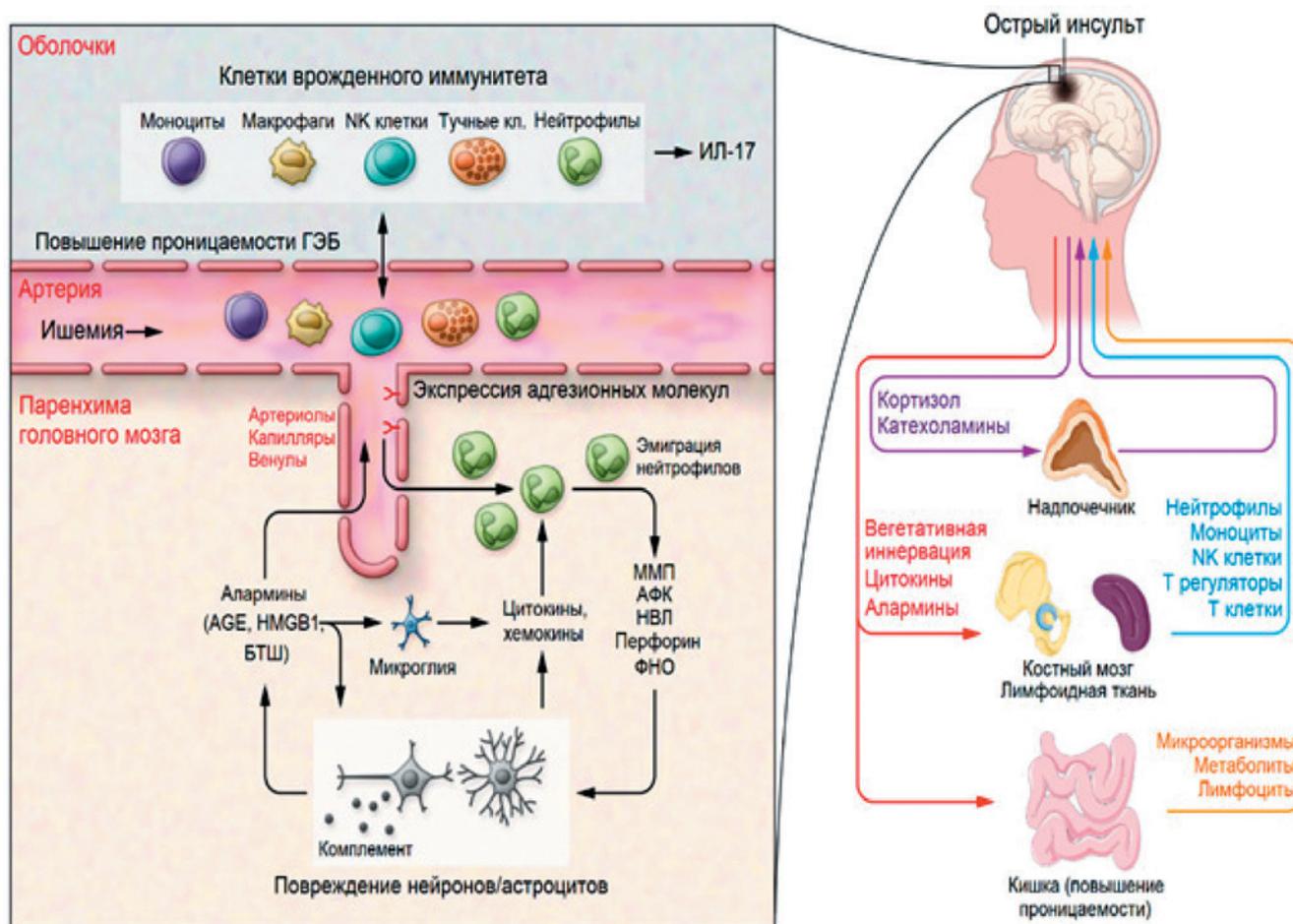
#### Активация врожденного иммунитета

Система врожденного иммунитета обеспечивает более быстрый ответ иммунной системы на повреждение, который не специфичен в отношении антигена. Важнейшая роль в запуске воспаления в данном случае принадлежит сигнальным молекулам, высвобождающимся из поврежденных нейронов и астроцитов (рис. 1). Такие молекулы, называемые аларминами или повреждение-ассоциированными молекулярными паттернами, в норме содержатся только во внутриклеточном компартменте, поэтому их появление во внеклеточной среде автоматически выполняет роль «сигнала опасности». К ним относятся белки теплового шока, белок высокомолекулярной группы белков бокс-1 (HMGB1), белок S100, некоторые липопептиды, аденозинтрифосфат (АТФ) и др. [4, 5]. Алармины паракринным путем воздействуют на различные типы паттерн-распознающих рецепторов, локализованных на резидентных иммунных клетках ГМ, к которым относятся клетки микроглии, дендритные клетки, менингеальные и периваскулярные макрофаги. Основными семействами паттерн-распознающих рецепторов (или рецепторов врожденного иммунитета) являются толл-подобные рецепторы, внутриклеточные NOD-рецепторы, рецепторы конечных продуктов гликирования, пуринергические P2Y<sub>4</sub> рецепторы и др. Связывание лиганда с соответствующим рецептором врожденного иммунитета вызывает в клетке активацию двух важнейших транскрипционных факторов — ядерного транскрипционного фактора κB (NFκB) и активаторного белка-1 (AP-1) [6]. Активированные транскрипционные факторы NFκB и AP-1 транслируются в ядро клетки, связываются с ДНК и разблокируют экспрессию большого количества генов, которые кодируют белки, участвующие в воспалении. В частности, под контролем NFκB находятся такие группы генов, как гены провоспалительных цитокинов, адгезионных молекул, белков острой фазы и др. Рассмотренный путь запуска воспаления требует активации экспрессии генов, что занимает существенное время. Между тем, известно, что проявления воспаления при ишемическом инсульте могут возникать существенно быстрее. Это заставило исследователей искать механизм «экстренного» восприятия сигналов повреждения. В настоящее время такой механизм связывают со сборкой под влиянием целого ряда факторов мультипротеинового комплекса, называемого

инфламмасомой. Активированная инфламماسома содержит активный фермент каспазу-1. Данный фермент осуществляет ограниченный протеолиз неактивных предшественников (пробелков) двух мощных провоспалительных цитокинов — проинтерлейкина-1β и проинтерлейкина-18. Превращение их в активный интерлейкин (ИЛ)-1β и ИЛ-18 делает возможным провоспалительный цитокиновый сигналинг уже через несколько минут после повреждения. В зависимости от белкового состава, выделяют несколько вариантов инфламماسом. В последние годы появляются данные о том, что при ишемии ГМ происходит сборка и активация инфламماسом NLRP1, NLRP2 и NLRC4, что позволяет рассматривать их в качестве терапевтических мишеней для лечения инсульта [7, 8].

Независимо от источника, увеличение локальной продукции в поврежденной зоне ГМ таких активных провоспалительных цитокинов, как ИЛ-1β, ИЛ-6, ИЛ-18, фактор некроза опухолей-α (TNF-α) и др., приводит к активации эндотелиоцитов и экспрессии на их мембране адгезионных молекул, относящихся к селектинам (P- и E-селектины) и суперсемейству иммуноглобулинов (ICAM-1, VCAM-1). В результате начинается важнейший этап воспаления — адгезия лейкоцитов к эндотелию, их эмиграция и накопление в зоне повреждения. Существует определенная последовательность выхода лейкоцитов в очаг повреждения. Так, эмиграция нейтрофилов начинается уже спустя 1–2 часа после начала ишемии, причем их максимальное количество в ткани ГМ отмечается на 1–3 сутки [9]. Нейтрофилам традиционно отводится негативная роль, заключающаяся в стимуляции вторичного повреждения за счет высвобождения агрессивных медиаторов воспаления — эластазы, матриксных металлопротеаз (ММП), активных форм кислорода (АФК), TNF-α, Fas лиганда и др. Это положение подтверждается результатами экспериментов, в которых снижение количества нейтрофилов в крови либо ингибирование их выхода в ткань ГМ приводит к уменьшению повреждения ГМ и улучшению исходов [10, 11].

Активация врожденного иммунитета происходит на локальном и системном уровнях. На местном уровне в результате ишемического повреждения нейронов и глиальных клеток из них высвобождаются повреждение-ассоциированные молекулярные паттерны или алармины, которые через рецепторы врожденного иммунитета активируют микроглию и другие клетки, что приводит к синтезу и высвобождению провоспалительных цитокинов и хемокинов. Параллельно происходит активация системы комплемента. Цитокины



**Рис. 1. Локальные и общие проявления активации системы врожденного иммунитета в острой стадии ишемического инсульта (Iadecola C, et al. (2020) [3])**

Примечание: ИЛ-17 — интерлейкин-17, ГЭБ — гематоэнцефалический барьер, AGE — конечные продукты гликирования, БТШ — белки теплового шока, HMGB1 — высокоподвижная группа белков бокс-1, ММП — матричные металлопротеиназы, АФК — активные формы кислорода, НВЛ — нейтрофильные внеклеточные ловушки, ФНО — фактор некроза опухолей.

Активация врожденного иммунитета происходит на локальном и системном уровне. На местном уровне в результате ишемического повреждения нейронов и глиальных клеток из них высвобождаются повреждение-ассоциированные молекулярные паттерны или алармины, которые через рецепторы врожденного иммунитета активируют микроглию и другие клетки, что приводит к синтезу и высвобождению провоспалительных цитокинов и хемокинов. Параллельно происходит активация системы комплемента. Цитокины стимулируют увеличение экспрессии в эндотелии адгезионных молекул, которые обеспечивают адгезию нейтрофилов и их эмиграцию. Нейтрофилы преимущественно оказывают повреждающее действие за счет продукции АФК, ММП, перфорина, цитокинов и внеклеточных ловушек. Костный мозг черепных костей может служить непосредственным источником клеток воспаления, локализованных в оболочках ГМ. На системном уровне повреждение ГМ запускает нейрогуморальный стрессорный ответ, который сопровождается усилением продукции катехоламинов и глюкокортикоидов в надпочечниках. Поступающие в системный кровоток алармины и цитокины стимулируют иммунную систему и мобилизуют клетки из костного мозга, лимфоидной ткани и кишки. Повышение проницаемости кишечного барьера сопровождается транслокацией бактерий, патоген-ассоциированных молекулярных паттернов и метаболитов в кровь.

**Figure 1. Local and systemic manifestations of innate immune system activation in the acute stage of ischemic stroke (Iadecola C, et al. (2020) [3])**

Note: IL-17 — interleukin-17, BBB — blood-brain barrier, AGE — advanced glycation end products, HSP — heat shock proteins, HMGB1 — high mobility group box-1 proteins, MMP — matrix metalloproteinases, ROS — reactive oxygen species, NETs — neutrophil extracellular traps, TNF — tumor necrosis factor.

стимулируют увеличение экспрессии в эндотелии адгезионных молекул, которые обеспечивают адгезию нейтрофилов и их эмиграцию. Нейтрофилы преимущественно оказывают повреждающее действие за счет продукции АФК, ММП, перфорина, цитокинов и внеклеточных ловушек. Костный мозг черепных костей может служить непосредственным источником клеток воспаления, локализованных в оболочках ГМ. На системном уровне повреждение ГМ запускает нейрогуморальный стрессорный ответ, который сопровождается усилением продукции катехоламинов и глюкокортикоидов в надпочечниках. Поступающие в системный кровоток алармины и цитокины стимулируют иммунную систему и мобилизуют клетки из костного мозга, лимфоидной ткани и кишки. Повышение проницаемости кишечного барьера сопровождается транслокацией бактерий, патоген-ассоциированных молекулярных паттернов и метаболитов в кровь.

Отдельным механизмом повреждения выступают нейтрофильные внеклеточные ловушки (НВЛ), представляющие собой нити ДНК, несущие на себе антимикробные пептиды. Усиленная адгезия нейтрофилов наряду с НВЛ и микротромбами была отмечена в микрососудах ГМ в периоде реперфузии, в связи с чем предполагается участие этих механизмов в возникновении феномена постишемического невосстановления кровотока (no-reflow), который заключается в отсутствии полноценной перфузии ткани на уровне микроциркуляторного русла, несмотря на восстановление проходимости магистральной артерии [12, 13]. Вместе с тем, роль нейтрофилов в процессе постишемического воспаления более неоднозначна, чем предполагалось ранее, о чем свидетельствуют неудачные попытки применения ингибиторов адгезии нейтрофилов в клинике [14]. Объяснение может заключаться в том, что популяция нейтрофилов является гетерогенной. Подобно макрофагам, нейтрофилы подразделяются на две фенотипические группы: N1, содержащие большие количества TNF- $\alpha$ , Fas, ICAM-1 и обладающие усиленной способностью к генерации АФК, и N2, экспрессирующие аргиназу, сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF) и рецепторы хемокинов [15]. При этом имеются данные о том, что N2 нейтрофилы играют важную роль в репарации после ишемического повреждения ГМ, стимулируя процессы ангиогенеза и нейропластичности [16]. Вслед за нейтрофилами в поврежденную ткань ГМ выходят моноциты, которые трансформируются в макрофаги. Одной из важнейших функций нейтрофилов и макрофагов в очаге повреждения является фагоцитоз фраг-

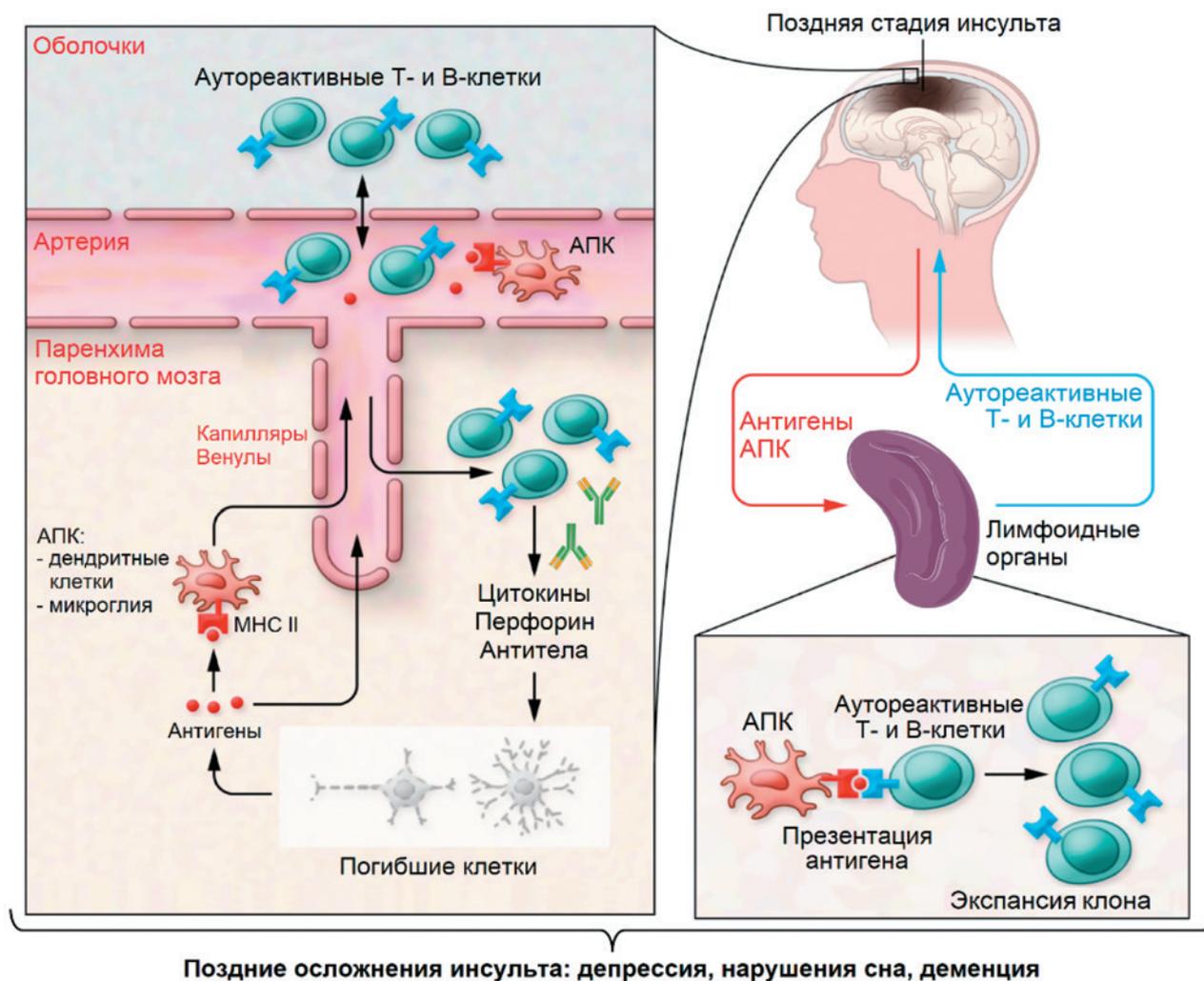
ментов погибших клеток. Поступление моноцитов в зону инфаркта регулируется хемокинами (CCL2/CCR2), а блокирование эмиграции моноцитов приводит к усугублению проявления ИРП ГМ [17]. Последними в очаг ишемии эмигрируют лимфоциты. Этот процесс начинается через 24–48 часов после начала ишемии. Т-клетки, также натуральные киллеры, сразу после эмиграции опосредуют вторичное повреждение ткани ГМ, о чем свидетельствует уменьшение зоны инфаркта у мышей с лимфопенией [18]. Механизм повреждения в данном случае не связан с распознаванием антигена Т-клеточным рецептором, а опосредован цитотоксичностью лимфоцитов врожденного иммунитета [19]. В противоположность эффекторным лимфоцитам, оказывающим вторичное повреждение, Т-регуляторы, появляющиеся в ишемическом очаге последними, обладают протективными эффектами за счет подавления нейровоспаления, в том числе путем секреции противовоспалительных цитокинов — ИЛ-10 и трансформирующего фактора роста- $\beta$  [20].

Большой интерес представляют пути проникновения лейкоцитов в очаг ишемии. Наиболее очевидным способом их поступления является прохождение через ГЭБ в зоне повреждения. Хорошо известно, что повышение проницаемости ГЭБ при ишемическом повреждении ГМ имеет двухфазный характер. Первая фаза возникает через 2–3 часа после начала ишемии и характеризуется увеличением трансцитоза [21]. Вторая фаза начинается через 24–48 часов и связана с протеолизом белков плотных контактов между соседними эндотелиоцитами, а также белков базальной мембраны [22]. Также при этом происходит потеря эндотелиоцитов, перицитов и отростков астроцитов [23]. Именно поздняя фаза повышения проницаемости ГЭБ сопровождается массивной инфильтрацией ткани ГМ лейкоцитами. Примечательно, что даже в этом случае нейтрофилы нередко скапливаются вокруг мелких сосудов в виде периваскулярных муфт и не продвигаются вглубь паренхимы, что связывают с барьерной функцией пограничной глиальной мембраны или латентным периодом, необходимым для активации новой транскрипционной программы, обеспечивающей активную миграцию [24]. Помимо прохождения через ГЭБ, в качестве возможных путей поступления нейтрофилов в очаг повреждения рассматривается их выход из лептоменингеальных сосудов и даже из костного мозга черепных костей [25], а также прохождение через сосудистое сплетение ГМ [26].

Система комплемента представляет собой важнейший механизм гуморального врожденного иммунитета. Активация системы комплемента,

проявляющаяся увеличением продукции опсоинов (C3b) и анафилотоксинов (C5a, C3a), сопряжена с неблагоприятными исходами ишемического инсульта [27]. Снижение уровня маннозосвязывающего лектина в эксперименте и у пациентов с ишемическим инсультом сопровождается улучшением исходов [28, 29].

В последние годы внимание исследователей привлекают не только местные проявления активации врожденного иммунитета при инсульте, но и возникающие системные изменения. Образующиеся в ишемическом очаге алармины, цитокины и хемокины проникают в кровь через поврежденный ГЭБ и индуцируют системное



**Рис. 2. Локальные и общие проявления активации системы адаптивного иммунитета в хронической стадии ишемического инсульта (Iadecola C, et al. (2020) [3])**

Примечание: АПК — антиген-презентирующие клетки, МНС II — главный комплекс гистосовместимости II класса.

Погибшие в результате ИРП клетки высвобождают антигены, которые распознаются АПК в ткани ГМ. АПК и сами антигены могут также поступать в системный кровоток. В результате происходит распознавание антигенов или задержка АПК в органах лимфоидной системы, где сигнал от АПК передается Т-хелперам 0, а затем Т-хелперам 1 или 2. В результате происходит созревание клонов аутореактивных Т- или В-клеток, вырабатывающих аутоантитела. Аутореактивные цитотоксические Т-клетки или аутоантитела могут проникать в ЦНС и вызывать хроническое воспаление, а также отдаленные неблагоприятные последствия инсульта.

**Figure 2. Local and systemic manifestations of adaptive immune system activation in the chronic stage of ischemic stroke (Iadecola C, et al. (2020) [3])**

Note: APC — antigen-presenting cells, МНС II — major histocompatibility complex class II.

воспаление путем активации иммунного ответа в лимфоидной ткани [30]. Отражением системного иммунного ответа является повышение в крови в первые 24 часа после возникновения ишемии ГМ основных провоспалительных цитокинов — ИЛ-6 и TNF- $\alpha$  [31]. Данная системная активация иммунитета сменяется противоположной реакцией — иммуносупрессией, которая является основной причиной инфекционных осложнений у пациентов, перенесших инсульт [32]. В роли основных механизмов иммуносупрессии и повышенного риска инфекционных осложнений выступают: 1) воздействие на иммунную систему повышенных уровней глюкокортикоидов; 2) действие активированной симпатoadrenalовой системы, проявляющееся в атрофии селезенки, апоптозе Т-клеток и NK-клеток [33]; 3) повышение проницаемости

кишечного эпителия, сопровождающееся транслокацией бактерий [34].

#### Активация адаптивного иммунитета

Данные экспериментальных и клинических исследований показывают, что ишемическое повреждение ГМ сопровождается также активацией системы адаптивного иммунитета, реагирующей на специфические антигены. Вскоре после ишемической гибели клеток ГМ их фрагменты фагоцитируются клетками активированной микроглии, дендритными клетками, а также вышедшими из кровеносных сосудов фагоцитами. Поскольку эти типы клеток экспрессируют на своей поверхности антигены главного комплекса гистосовместимости II класса (МНС II), они способны презентировать антигены Т-хелперам 0 (рис. 2). Презентация

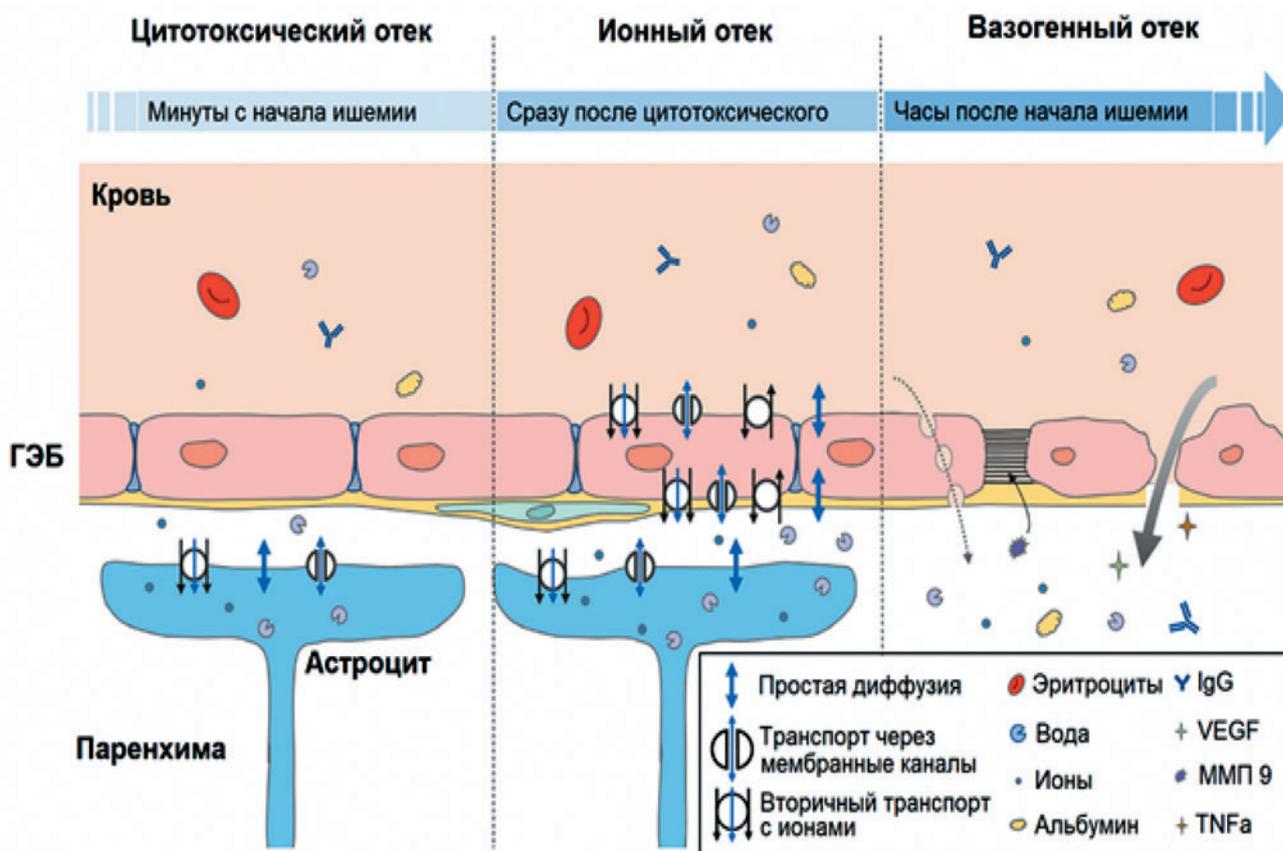


Рис. 3. Механизмы формирования отека головного мозга при ишемическом инсульте (Gu Y, et al. (2022) [42])

Примечание: ГЭБ — гематоэнцефалический барьер, IgG — иммуноглобулины класса G, VEGF — сосудистый эндотелиальный фактор роста, MMP 9 — матриксные металлопротеиназы 9, TNF- $\alpha$  — фактор некроза опухоли-альфа.

Figure 3. Mechanisms of brain edema formation in ischemic stroke (Gu Y, et al. (2022) [42])

Note: BBB — blood-brain barrier, IgG — immunoglobulin G, VEGF — vascular endothelial growth factor, MMP 9 — matrix metalloproteinase 9, TNF- $\alpha$  — tumor necrosis factor-alpha.

антигенов может происходить как в ткани ГМ, так и в регионарных лимфоузлах и селезенке, куда мигрируют активированные антиген-презентирующие клетки (АПК). В результате формируются клоны аутореактивных Т- и В-лимфоцитов, которые способны повреждать ткань ГМ в процессе антиген-зависимой аутоиммунной реакции [35]. Показано, что у пациентов с инсультом периферические лимфоциты на второй неделе после заболевания оказывают более выраженное повреждающее действие на миелин, чем у лиц контрольной группы и даже у больных рассеянным склерозом [36]. После инсульта показано также увеличение образования антител против антигенов ЦНС [37]. В настоящее время в литературе активно обсуждается гипотеза, в соответствии с которой активация врожденного и адаптивного иммунитета в форме нейровоспаления в позднем периоде инсульта может играть патогенетическую роль в развитии таких его осложнений, как деменция, депрессия и утомляемость [38].

Погибшие в результате ИРП клетки высвобождают антигены, которые распознаются АПК в ткани ГМ. АПК и сами антигены могут также поступать в системный кровоток. В результате происходит распознавание антигенов или задержка АПК в органах лимфоидной системы, где сигнал от АПК передается Т-хелперам 0, а затем Т-хелперам 1 или 2. Как следствие, созревают клоны аутореактивных Т- или В-клеток, вырабатывающих аутоантитела. Аутореактивные цитотоксические Т-клетки или аутоантитела могут проникать в ЦНС и вызывать хроническое воспаление, а также отдаленные неблагоприятные последствия инсульта.

Таким образом, асептическое воспаление представляет собой важнейший этап патогенеза ИРП ГМ при ишемическом инсульте. Биологическое значение воспаления зависит от реактивности организма и сроков после начала ишемии. Ранняя фаза воспаления в основном представляет собой механизм вторичного повреждения ГМ. Поздняя фаза воспаления, возникающая после завершения удаления фрагментов погибших клеток в процессе фагоцитоза и изменения профиля цитокинов с провоспалительного на противовоспалительный, может иметь саногенетическое значение, поскольку сопряжена со стимуляцией ангиогенеза, нейрогенеза и нейропластичности.

#### **Механизмы развития отека при ишемии головного мозга**

Отек ГМ представляет собой опасное осложнение ишемического инсульта. Летальность при прогрессирующем отеке ГМ может достигать 80 %

[39]. Показано, что смещение срединных структур ГМ более чем на 3 мм является независимым предиктором неблагоприятных исходов при ишемическом инсульте [40]. В зависимости от механизма развития отека ГМ его подразделяют на три типа, которые сменяют друг друга соответственно сроку с момента начала ишемии: цитотоксический, ионный и вазогенный [41] (рис. 3). Наиболее ранним вариантом отека, который начинает формироваться уже спустя несколько минут после наступления ишемии, является цитотоксический.

Важнейшим механизмом формирования цитотоксического отека выступают нарушения ионного гомеостаза клеток ГМ в зоне ишемии. Вследствие дисфункции  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы в клетках увеличивается содержание  $\text{Na}^+$ , воды и  $\text{Cl}^-$ , что сопровождается набуханием клеток и их дисфункцией. Показано, что наиболее ранние и выраженные изменения при этом происходят в астроцитах. Существуют три способа проникновения воды в астроциты, которые активируются при цитотоксическом отеке [43]. Во-первых, возможна простая диффузия воды через билипидный слой [44]. Во-вторых, вода может поступать в астроциты через специфические каналы, важнейшими из которых являются аквапорины. Известно, что усиление экспрессии аквапорина 4 при ишемическом инсульте ассоциировано с развитием отека ГМ [45]. Помимо аквапоринов, молекулы воды могут проникать в клетку через такие каналы, как натрий-глюкозный котранспортер-1 и транспортеры глюкозы 1 и 2 [46, 47]. В-третьих, возможен котранспорт воды вместе с ионами натрия, которые поступают в клетку путем активного энергозависимого транспорта через мембранные насосы. Примерами таких конститутивно экспрессирующихся в астроцитах насосов являются транспортер возбуждающих аминокислот 1 (EAAT1) и трансмембранные ионные котранспортеры катионов и хлора (NKCC1). Существуют также каналы этого рода, экспрессия которых активируется только при повреждении ГМ. Примером может служить канал моновалентных катионов SUR1-TRPM4, обеспечивающий при ишемии поступление натрия в астроциты и нейроны для компенсации кальциевой перегрузки. При тяжелом повреждении ГМ активность SUR1-TRPM4 может иметь патогенетическое значение за счет стимуляции внутриклеточного отека [48]. Фармакологическая блокада данного канала предотвращает цитотоксический отек [49].

Цитотоксический отек сменяется ионным отеком, при котором в процесс транспорта воды в интерстиций ГМ вовлекаются эндотелиоциты (рис. 3). Ионный отек характеризуется активизацией

транспорта воды через ГЭБ и условно проходит две фазы: а) поступление электролитов и воды из просвета сосудов в эндотелиоциты и б) выход жидкости из эндотелиоцитов в периваскулярное пространство и интерстиций. Иными словами, речь идет о трансэндотелиальном переносе жидкости при сохранном, но дисфункционирующем эндотелии. Астроциты также участвуют в формировании ионного отека. Механизмы прохождения воды через люминальную и аблюминальную мембрану эндотелиоцитов сходны с ранее рассмотренными тремя механизмами поступления воды в астроциты, хотя при этом и имеются некоторые отличия в задействованных в процессе трансмембранных белках. Так, вторичный котранспорт воды осуществляется на люминальной мембране эндотелиоцита за счет NKCC1 [50], а на аблюминальной мембране — за счет  $K^+/Cl^-$ -котранспортера [51]. Пассивный транспорт воды обеспечивается транспортерами глюкозы 1 и 2, которые присутствуют и на люминальной, и на аблюминальной мембране эндотелиоцита, и натрий-глюкозным котранспортером-1, который экспрессируется только на люминальной мембране. Среди индуцируемых транспортеров определенная роль может принадлежать каналу моновалентных катионов SUR1-TRPM4 [42].

Вазогенный отек ГМ возникает в более позднем периоде после наступления ишемии и характеризуется повреждением и увеличением проницаемости ГЭБ [52]. Повышение проницаемости ГЭБ при прогрессирующей ишемии ГМ связано со следующими механизмами. Во-первых, отмечается увеличение трансцеллюлярного транспорта жидкости через эндотелиальную выстилку в составе мембранных везикул. Данный процесс, называемый трансцитозом, является энергозависимым и активируется при ишемии ГМ [53]. Во-вторых, отмечается сборка сократительных белков и сокращение эндотелиоцитов, в результате чего увеличивается расстояние между соседними эндотелиоцитами [54]. Несколько позже происходит повреждение белков плотных контактов между эндотелиоцитами и белков базальной мембраны протеолитическими ферментами, высвобождающимися из эмигрирующих нейтрофилов. Наиболее изучено воздействие на белки плотных контактов ферментов из семейства ММП, которые активируются при ишемии ГМ активными формами кислорода и провоспалительными цитокинами. Повышение парацеллюлярной проницаемости может происходить и на более тонком уровне — за счет уменьшения экспрессии белков плотных контактов под действием VEGF [55]. Известно, что раннее введение рекомбинантного VEGF усили-

вает формирование отека при экспериментальном инсульте [56]. Дополнительным фактором, способствующим возникновению вазогенного отека, является реперфузионное повреждение ГМ, связанное в первую очередь с усилением продукции активных форм кислорода и активацией процесса воспаления [57]. Предотвращение свободнорадикального повреждения, сопряженного с восстановлением кровотока, приводит к уменьшению выраженности отека на модели окклюзии средней мозговой артерии у крыс [58].

Механизмы, лежащие в основе вазогенного отека, во многом сходны с механизмами развития другого серьезного осложнения инсульта — ГТ. Некоторые авторы рассматривают вазогенный отек и ГТ как последовательные звенья одной патогенетической цепочки.

### **Механизмы геморрагической трансформации очага**

ГТ очага является одним из наиболее тяжелых осложнений ишемического инсульта [59]. Ее возникновение ассоциировано с повышением летальности в остром периоде и ухудшением восстановления после перенесенного инсульта. Хотя ГТ может проявляться и при отсутствии каких-либо лечебных мероприятий [60], риск ее возникновения увеличивается при выполнении тромболитической терапии [61]. При этом риск ГТ особенно высок, если с момента начала симптомов проходит более 4,5 часа. Именно этот факт ограничивает продолжительность терапевтического окна тромболиза периодом в 4,5 часа. Важнейшим механизмом развития ГТ является ИРП ГЭБ, сопровождающееся повышением его проницаемости. При этом восстановление кровотока в зону повреждения приводит к разрыву микрососудов и вторичному кровоизлиянию. В более легких случаях кровоизлияние происходит путем диапедеза эритроцитов. Степень выраженности ГТ может существенно варьировать от бессимптомной петехиальной ГТ до паренхиматозной гематомы, занимающей более 30 % участка инфаркта и обладающей масс-эффектом [62]. На вероятность развития ГТ и степень ее выраженности оказывают влияние многие факторы, которые можно подразделить на клинические особенности пациента (возраст, получаемая терапия, сопутствующие заболевания), характеристики инсульта (локализация, размер ядра инфаркта, длительность наблюдения), способ реваascularизации (тромболизис, тромбоэкстракция или сочетание этих методов), генетические факторы (дефицит прокоагулянтов, гиперактивация системы фибринолиза). Некоторые авторы выделяют раннюю ГТ,



удин-5 и окклюдин) и волокна коллагена IV типа в базальной мембране. В процессе ИРП ГМ данные белки подвергаются частичному протеолизу, выраженность которого и определяет вероятность развития ГТ. В настоящее время ведущая роль в протеолитической деградации белков плотных контактов и базальной мембраны отводится двум протеолитическим системам — ММП и тканевому активатору плазминогена (tPA). ММП представляют собой большое семейство цинковых эндопептидаз, обладающих способностью к лизису белков матрикса, в том числе в ГМ [64]. Имеющиеся экспериментальные и клинические данные свидетельствуют, что в процессе формирования ГТ играют важную роль такие представители семейства ММП, как ММП-2, ММП-3 и ММП-9 [65]. Генетическая делеция ММП-2 и ММП-9 предотвращает деградацию коллагена и окклюдина, что уменьшает выраженность ГТ после ишемии-реперфузии ГМ у мышей [66]. Назначение ингибитора ММП-9 миноциклина пациентам с ишемическим инсультом, получавшим тромболитическую терапию, сопровождалось улучшением клинических исходов [67].

Ранняя ГТ возникает преимущественно за счет повреждения ГЭБ, индуцированного со стороны просвета церебральных сосудов, что связано с воздействием на плотные контакты и базальную мембрану рекомбинантного tPA, ММП-3 из эндотелия, а также ММП-2 и ММП-9 из адгезированных и мигрирующих нейтрофилов. Поздняя ГТ возникает в результате повреждения ГЭБ, спровоцированного тканевыми факторами, включая эндогенный tPA, при нейровоспалении.

Основным источником ММП-9 при ИРП ГМ являются нейтрофилы и клетки микроглии. При этом ММП-3 преимущественно экспрессируется в эндотелиоцитах, а ММП-2 — в астроцитах. Вторая протеолитическая система, ответственная за повышение проницаемости ГЭБ — это система tPA. Помимо прямого повреждающего действия на белки плотных контактов, tPA обладает способностью запускать апоптоз и активировать другие протеазы, в частности, ММП-9 и ММП-3 [68]. Необходимо отметить, что tPA при ишемическом инсульте может иметь двойное происхождение — экзогенное в результате введения рекомбинантного tPA при тромболитической терапии и эндогенное, поскольку tPA активно синтезируется в нейронах и микроглии [69]. Поэтому считается, что экзогенно вводимый tPA может играть более важную роль в возникновении ранней ГТ, тогда как поздняя ГТ в большей степени опосредована усилением экспрессии и высвобождением эндогенного tPA из клеток ГМ, а также механизмами нейро-

воспаления с инфильтрацией ткани лейкоцитами, высвобождающими ММП и другие протеазы. Определенное значение в формировании ранней ГТ придается и развивающейся под действием tPA коагулопатии, которая сама по себе может сопровождаться геморрагическими осложнениями, самым опасным из которых является субарахноидальное кровоизлияние. Важнейшим механизмом активации ММП при ИРП ГМ являются активные формы кислорода, которые, наряду с провоспалительными цитокинами, усиливают экспрессию ММП в клетке [70]. Не менее важная роль в патологическом увеличении проницаемости ГЭБ при ишемическом инсульте принадлежит хемокинам CCL-2 и CXCL-8 [71].

### Заключение

Нейрональное повреждение при ишемическом инсульте посредством высвобождения аларминов и сборки инфламмосомы запускает классический воспалительный каскад. В процессе вторичного иммунного повреждения ГМ принимают участие как механизмы врожденного иммунитета, проявляющиеся лейкоцитарной инфильтрацией поврежденного участка ГМ, так и антиген-зависимые реакции адаптивного иммунитета. Активация иммунной системы приводит не только к локальным, но и к системным изменениям в организме. Одним из важнейших проявлений нейровоспаления при ИРП ГМ является повышение транс- и парацеллюлярной проницаемости ГЭБ, которое лежит в основе развития вазогенного отека ГМ после инсульта. При резком, неизбирательном повышении проницаемости ГЭБ, патогенетически связанном с реперфузией ГМ, и возникающей под действием рекомбинантного tPA и эндогенных ММП деградацией белков плотных контактов между эндотелиоцитами и коллагена базальной мембраны капилляров, увеличивается риск ГТ очага при инсульте. Защита нейроваскулярной единицы от ИРП, сопровождающегося критическим повышением проницаемости ГЭБ и увеличением вероятности ГТ, представляет собой одну из важнейших нерешенных задач в области нейропротекции. Ее решение может способствовать расширению рамок терапевтического окна при тромболитическом лечении, а, следовательно, улучшению прогноза у 80–85 % пациентов с ишемическим инсультом.

### Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

**Благодарности / Acknowledgments**

Исследование выполнено в рамках приоритетного государственного задания ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России «Разработка универсального метода мультиорганной консервации донорских органов» / The study was carried out within the framework of the priority state task of the Almazov National Medical Research Centre «Development of a universal method of multi-organ preservation of donor organs».

**Список литературы / References**

- Garcia JH, Liu KF, Yoshida Y, et al. Influx of leukocytes and platelets in an evolving brain infarct (Wistar rat). *Am J Pathol.* 1994; 144(1):188–199.
- Mena H, Cadavid D, Rushing EJ. Human cerebral infarct: a proposed histopathologic classification based on 137 cases. *Acta Neuropathol.* 2004; 108(6):524–530.
- Iadecola C, Buckwalter MS, Anrather J. Immune responses to stroke: mechanisms, modulation, and therapeutic potential. *J Clin Invest.* 2020; 130(6):2777–2788.
- Nakamura K, Shichita T. Cellular and molecular mechanisms of sterile inflammation in ischaemic stroke. *J Biochem.* 2019; 165(6):459–464.
- Koyama R, Shichita T. Glial roles in sterile inflammation after ischemic stroke. *Neurosci Res.* 2023; 187:67–71.
- Zhao D, Zeng Z, Mo H, et al. Orexin-A inhibits cerebral ischaemic inflammatory injury mediated by the nuclear factor- $\kappa$ B signalling pathway and alleviates stroke-induced immunodepression in mice. *Brain Res Bull.* 2021; 174:296–304.
- Puleo MG, Miceli S, Di Chiara T, et al. Molecular Mechanisms of Inflammasome in Ischemic Stroke Pathogenesis. *Pharmaceuticals (Basel).* 2022; 15(10):1168.
- Gao L, Dong Q, Song Z, et al. NLRP3 inflammasome: a promising target in ischemic stroke. *Inflamm Res.* 2017; 66(1):17–24.
- Gronberg NV, Johansen FF, Kristiansen U, et al. Leukocyte infiltration in experimental stroke. *J Neuroinflammation.* 2013; 10:115.
- Herz J, Sabellek P, Lane TE, et al. Role of neutrophils in exacerbation of brain injury after focal cerebral ischemia in hyperlipidemic mice. *Stroke.* 2015; 46(10):2916–2925.
- Wang C, Börger V, Sardari M, et al. Mesenchymal stromal cell-derived small extracellular vesicles induce ischemic neuroprotection by modulating leukocytes and specifically neutrophils. *Stroke.* 2020; 51(6):1825–1834.
- El Amki M, Glück C, Binder N, et al. Neutrophils obstructing brain capillaries are a major cause of no-reflow in ischemic stroke. *Cell Rep.* 2020; 33(2):108260.
- De Meyer SF, Langhauser F, Haupeltshofer S, et al. Thromboinflammation in brain ischemia: recent updates and future perspectives. *Stroke.* 2022; 53(5):1487–1499.
- Elkind MSV, Veltkamp R, Montaner J, et al. Natalizumab in acute ischemic stroke (ACTION II): a randomized, placebo-controlled trial. *Neurology.* 2020; 95(8):e1091–e1104.
- Mohamud Yusuf A, Hagemann N, Ludewig P, et al. Roles of polymorphonuclear neutrophils in ischemic brain injury and post-ischemic brain remodeling. *Front Immunol.* 2022; 12:825572.
- García-Culebras A, Durán-Laforet V, Peña-Martínez C, et al. Role of TLR4 (Toll-Like Receptor 4) in N1/N2 neutrophil programming after stroke. *Stroke.* 2019; 50(10):2922–2932.
- García-Bonilla L, Faraco G, Moore J, et al. Spatio-temporal profile, phenotypic diversity, and fate of recruited monocytes into the post-ischemic brain. *J Neuroinflammation.* 2016; 13(1):285.
- Hurn PD, Subramanian S, Parker SM, et al. T- and B-cell-deficient mice with experimental stroke have reduced lesion size and inflammation. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2007; 27(11):1798–1805.
- Kleinschnitz C, Schwab N, Kraft P, et al. Early detrimental T-cell effects in experimental cerebral ischemia are neither related to adaptive immunity nor thrombus formation. *Blood.* 2010; 115(18):3835–3842.
- Liesz A, Suri-Payer E, Veltkamp C, et al. Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke. *Nat Med.* 2009; 15(2):192–199.
- Knowland D, Arac A, Sekiguchi KJ, et al. Stepwise recruitment of transcellular and paracellular pathways underlies blood-brain barrier breakdown in stroke. *Neuron.* 2014; 82(3):603–617.
- Yang C, Hawkins KE, Doré S, et al. Neuroinflammatory mechanisms of blood-brain barrier damage in ischemic stroke. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2019; 316(2):C135–C153.
- Yang Y, Rosenberg GA. Blood-brain barrier breakdown in acute and chronic cerebrovascular disease. *Stroke.* 2011; 42(11):3323–3328.
- Allen C, Thornton P, Denes A, et al. Neutrophil cerebrovascular transmigration triggers rapid neurotoxicity through release of proteases associated with decondensed DNA. *J Immunol.* 2012; 189(1):381–392.
- Herisson F, Frodermann V, Courties G, et al. Direct vascular channels connect skull bone marrow and the brain surface enabling myeloid cell migration. *Nat Neurosci.* 2018; 21(9):1209–1217.
- Engelhardt B, Wolburg-Buchholz K, Wolburg H. Involvement of the choroid plexus in central nervous system inflammation. *Microsc Res Tech.* 2001; 52(1):112–129.
- Széplaki G, Szegedi R, Hirschberg K, et al. Strong complement activation after acute ischemic stroke

- is associated with unfavorable outcomes. *Atherosclerosis*. 2009; 204(1):315–320.
28. Orsini F, Fumagalli S, Császár E, et al. Mannose-Binding Lectin Drives Platelet Inflammatory Phenotype and Vascular Damage After Cerebral Ischemia in Mice via IL (Interleukin)-1 $\alpha$ . *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2018; 38(11):2678–2690.
  29. Osthoff M, Katan M, Fluri F, et al. Mannose-binding lectin deficiency is associated with smaller infarction size and favorable outcome in ischemic stroke patients. *PLoS One*. 2011; 6(6):e21338.
  30. Bower NI, Hogan BM. Brain drains: new insights into brain clearance pathways from lymphatic biology. *J Mol Med (Berl)*. 2018; 96(5):383–390.
  31. Chapman KZ, Dale VQ, Dénes A, et al. A rapid and transient peripheral inflammatory response precedes brain inflammation after experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2009; 29(11):1764–1768.
  32. Langhorne P, Stott DJ, Robertson L, et al. Medical complications after stroke: a multicenter study. *Stroke*. 2000; 31(6):1223–1229.
  33. Prass K, Meisel C, Höflich C, et al. Stroke-induced immunodeficiency promotes spontaneous bacterial infections and is mediated by sympathetic activation reversal by poststroke T helper cell type 1-like immunostimulation. *J Exp Med*. 2003; 198(5):725–736.
  34. Singh V, Roth S, Llovera G, et al. Microbiota Dysbiosis Controls the Neuroinflammatory Response after Stroke. *J Neurosci*. 2016; 36(28):7428–7440.
  35. Ortega SB, Noorbhai I, Poinatte K, et al. Stroke induces a rapid adaptive autoimmune response to novel neuronal antigens. *Discov Med*. 2015; 19(106):381–392.
  36. Youngchaiyud U, Coates AS, Whittingham S, et al. Cellular-immune response to myelin protein: absence in multiple sclerosis and presence in cerebrovascular accidents. *Aust N Z J Med*. 1974; 4(6):535–538.
  37. Prüss H, Iggena D, Baldinger T, et al. Evidence of intrathecal immunoglobulin synthesis in stroke: a cohort study. *Arch Neurol*. 2012; 69(6):714–717.
  38. Kliper E, Bashat DB, Bornstein NM, et al. Cognitive decline after stroke: relation to inflammatory biomarkers and hippocampal volume. *Stroke*. 2013; 44(5):1433–1435.
  39. Nawabi J, Flottmann F, Hanning U, et al. Futile Recanalization With Poor Clinical Outcome Is Associated With Increased Edema Volume After Ischemic Stroke. *Invest Radiol*. 2019; 54(5):282–287.
  40. McKeown ME, Prasad A, Kobsa J, et al. Midline Shift Greater than 3 mm Independently Predicts Outcome After Ischemic Stroke. *Neurocrit Care*. 2022; 36(1):46–51.
  41. Zadvornov AA, Golomidov AV, Grigoriev EV. Clinical pathophysiology of cerebral edema (part 2). Messenger of Anesthesiology and Resuscitation. 2017; 14(4):52–60. In Russian [Задворнов А.А., Голомидов А.В., Григорьев Е.В. Клиническая патофизиология отека головного мозга (часть 2). Вестник анестезиологии и реаниматологии. 2017; 14(4):52–60].
  42. Gu Y, Zhou C, Piao Z, et al. Cerebral edema after ischemic stroke: Pathophysiology and underlying mechanisms. *Front Neurosci*. 2022; 16:988283.
  43. Stokum JA, Gerzanich V, Simard JM. Molecular pathophysiology of cerebral edema. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2016; 36(3):513–538.
  44. MacAulay N. Molecular mechanisms of brain water transport. *Nat Rev Neurosci*. 2021; 22(6):326–344.
  45. Kitchen P, Salman MM, Halsey AM, et al. Targeting Aquaporin-4 Subcellular Localization to Treat Central Nervous System Edema. *Cell*. 2020; 181(4):784–799.e19.
  46. Zeuthen T, Meinild AK, Klaerke DA, et al. Water transport by the Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter under isotonic conditions. *Biol Cell*. 1997; 89(5-6):307–312.
  47. MacAulay N, Zeuthen T. Water transport between CNS compartments: contributions of aquaporins and cotransporters. *Neuroscience*. 2010; 168(4):941–956.
  48. Chen M, Dong Y, Simard JM. Functional coupling between sulfonylurea receptor type 1 and a nonselective cation channel in reactive astrocytes from adult rat brain. *J Neurosci*. 2003; 23(24):8568–8577.
  49. Simard JM, Yurovsky V, Tsybalyuk N, et al. Protective effect of delayed treatment with low-dose glibenclamide in three models of ischemic stroke. *Stroke*. 2009; 40(2):604–609.
  50. Hamann S, Herrera-Perez JJ, Zeuthen T, et al. Cotransport of water by the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> cotransporter NKCC1 in mammalian epithelial cells. *J Physiol*. 2010; 588:4089–4101.
  51. Zeuthen T. Cotransport of K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> and H<sub>2</sub>O by membrane proteins from choroid plexus epithelium of *Necturus maculosus*. *J Physiol*. 1994; 478:203–219.
  52. Chen S, Shao L, Ma L. Cerebral Edema Formation After Stroke: Emphasis on Blood-Brain Barrier and the Lymphatic Drainage System of the Brain. *Front Cell Neurosci*. 2021; 15:716825.
  53. Zhang C, Jiang M, Wang WQ, et al. Selective mGluR1 Negative Allosteric Modulator Reduces Blood-Brain Barrier Permeability and Cerebral Edema After Experimental Subarachnoid Hemorrhage. *Transl Stroke Res*. 2020; 11(4):799–811.
  54. Moy AB, Van Engelenhoven J, Bodmer J, et al. Histamine and thrombin modulate endothelial focal adhesion through centripetal and centrifugal forces. *J Clin Invest*. 1996; 97(4):1020–1027.
  55. Dore-Duffy P, Wang X, Mehedi A, et al. Differential expression of capillary VEGF isoforms following traumatic brain injury. *Neurol Res*. 2007; 29(4):395–403.
  56. Zhang ZG, Zhang L, Jiang Q, et al. VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain. *J Clin Invest*. 2000; 106(7):829–838.

57. Winkler L, Blasig R, Breitzkreuz-Korff O, et al. Tight junctions in the blood-brain barrier promote edema formation and infarct size in stroke - Ambivalent effects of sealing proteins. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2021; 41(1):132–145.
58. Xing L, Wang B, Li J, et al. A Fluorogenic ONOO--Triggered Carbon Monoxide Donor for Mitigating Brain Ischemic Damage. *J Am Chem Soc.* 2022; 144(5):2114–2119.
59. Wang W, Li M, Chen Q, et al. Hemorrhagic Transformation after Tissue Plasminogen Activator Reperfusion Therapy for Ischemic Stroke: Mechanisms, Models, and Biomarkers. *Mol Neurobiol.* 2015; 52(3):1572–1579.
60. Campos F, Qin T, Castillo J, et al. Fingolimod reduces hemorrhagic transformation associated with delayed tissue plasminogen activator treatment in a mouse thromboembolic model. *Stroke.* 2013; 44(2):505–511.
61. Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, et al. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med.* 2008; 359(13):1317–1329.
62. Laszlo JM, Hortobágyi T. Hemorrhagic transformation of ischemic stroke. *Vasc Dis Therap.* 2017; 2:1–25.
63. Hong JM, Kim DS, Kim M. Hemorrhagic Transformation After Ischemic Stroke: Mechanisms and Management. *Front Neurol.* 2021; 12:703258.
64. Rosenberg GA. Matrix metalloproteinases in neuroinflammation. *Glia.* 2002; 39(3):279–291.
65. Rosell A, Ortega-Aznar A, Alvarez-Sabin J, et al. Increased brain expression of matrix metalloproteinase-9 after ischemic and hemorrhagic human stroke. *Stroke.* 2006; 37(6):1399–1406.
66. Suofu Y, Clark JF, Broderick JP, et al. Matrix metalloproteinase-2 or -9 deletions protect against hemorrhagic transformation during early stage of cerebral ischemia and reperfusion. *Neuroscience.* 2012; 212:180–189.
67. Switzer JA, Hess DC, Ergul A, et al. Matrix metalloproteinase-9 in an exploratory trial of intravenous minocycline for acute ischemic stroke. *Stroke.* 2011; 42(9):2633–2635.
68. Wang X, Lee SR, Arai K, et al. Lipoprotein receptor-mediated induction of matrix metalloproteinase by tissue plasminogen activator. *Nat Med.* 2003; 9(10):1313–1317.
69. Tsirka SE, Rogove AD, Bugge TH, et al. An extracellular proteolytic cascade promotes neuronal degeneration in the mouse hippocampus. *J Neurosci.* 1997; 17(2):543–552.
70. Krizanac-Bengez L, Hossain M, Fazio V, et al. Loss of flow induces leukocyte-mediated MMP/TIMP imbalance in dynamic in vitro blood-brain barrier model: role of pro-inflammatory cytokines. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006; 291(4):C740–C749.
71. Dimitrijevic OB, Stamatovic SM, Keep RF, et al. Absence of the chemokine receptor CCR2 protects against cerebral ischemia/reperfusion injury in mice. *Stroke.* 2007; 38(4):1345–1353.

#### Информация об авторах:

Шиленко Леонид Алексеевич, лаборант-исследователь НИЛ патологии малого круга кровообращения ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России; студент ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И. П. Павлова Минздрава России;

Карпов Андрей Александрович, Карпов Андрей Александрович, к.м.н., заведующий НИЛ патологии малого круга кровообращения, доцент кафедры патологии Института медицинского образования ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России; ведущий научный сотрудник отдела «Технологии сильного искусственного интеллекта в физиологии и медицине» СПбГЭТУ «ЛЭТИ»;

Веретенникова Елизавета Ивановна, клинический ординатор 2-го года кафедры факультетской терапии им. профессора В. А. Вальдмана, ФГБОУ ВО СПбГПМУ Минздрава России;

Галагудза Михаил Михайлович, дд.м.н., профессор и член-корреспондент РАН, директор Института экспериментальной медицины, заведующий кафедрой патологии Института медицинского образования ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России; профессор кафедры патофизиологии с курсом клинической патофизиологии ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России.

#### Authors information:

Leonid A. Shilenko, Laboratory Assistant of Laboratory of Pulmonary Vascular Disease, Almazov National Medical Research Centre; Student of the Academician I. P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University;

Andrei A. Karpov, PhD, Head of Laboratory of Pulmonary Vascular Disease, Associate Professor of the Department of Pathology, Almazov National Medical Research Centre; Leading Researcher of the Department of “Strong Artificial Intelligence Technologies in Physiology and Medicine”, Saint Petersburg Electrotechnical University “LETI”;

Elizaveta I. Veretennikova, 2nd year Resident Physician at the Department of Faculty Therapy named after Professor V. A. Valdman, Saint Petersburg State Pediatric Medical University;

Michael M. Galagudza, MD, DSc, Director of Institute of Experimental Medicine, Head of the Department of Pathology, Institute of Medical Education, Almazov National Medical Research Centre, Professor and Corresponding Member of the Russian Academy of Science; Professor at the Department of Pathophysiology, Academician I. P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University.

## ВЕРХНЕШЕЙНАЯ СИМПАТЭКТОМИЯ ПРИ НЕЙРОВАСКУЛЯРНОЙ ПАТОЛОГИИ

**Веснина А. А., Самочерных К. А., Семенютин В. Б.**

Российский научно-исследовательский нейрохирургический институт имени профессора А. Л. Поленова — филиал Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

**Контактная информация:**

Веснина Анастасия Андреевна,  
РНХИ им. проф. А. Л. Поленова —  
филиал ФГБУ «НМИЦ им. В. А.  
Алмазова» Минздрава России,  
ул. Маяковского, д. 12, Санкт-Петербург,  
Россия, 191014.  
E-mail: anastasya.vesnina@mail.ru

*Статья поступила в редакцию 28.07.2023  
и принята к печати 02.11.2023*

### Резюме

Эффективность верхнешейной симпатэктомии при лечении пациентов с невровакулярной патологией обсуждается в работах исследователей в течение многих лет. Однако показания к проведению данной операции до сих пор нуждаются в уточнении. Динамика мозгового кровотока при проведении симпатической блокады не смогла стать однозначным критерием определения показаний к оперативному лечению. Изменение церебрального перфузионного давления при невровакулярной патологии может активировать нейрогенный механизм регуляции мозгового кровотока. Обоснована необходимость поиска новых методов оценки интенсивности воздействия вегетативной нервной системы на тонус мозговых сосудов (нейрогенного механизма регуляции мозгового кровотока) для уточнения показаний к проведению верхнешейной симпатэктомии у больных с невровакулярной патологией. В обзоре высказывается гипотеза о связи внутричерепных В-волн с состоянием нейрогенного механизма регуляции мозгового кровотока.

**Ключевые слова:** блокада симпатического ганглия, верхнешейная симпатэктомия, внутричерепные В-волны, нейрогенный механизм, регуляция мозгового кровотока, церебральное перфузионное давление.

*Для цитирования: Веснина А.А., Самочерных К.А., Семенютин В.Б. Верхнешейная симпатэктомия при невровакулярной патологии. Трансляционная медицина. 2023;10(6):581-590. DOI: 10.18705/2311-4495-2023-10-6-581-590. EDN: PLFQUI*

## UPPER CERVICAL SYMPATHECTOMY IN NEUROVASCULAR PATHOLOGY

Anastasiia A. Vesnina, Konstantin A. Samochnykh,  
Vladimir B. Semenyutin

Polenov Russian Scientific Research Institute of Neurosurgery— branch  
of the Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg,  
Russia

**Corresponding author:**

Anastasiia A. Vesnina,  
Polenov Russian Scientific Research Institute  
of Neurosurgery,  
Mayakovskaya str., 12, Saint Petersburg,  
Russia, 191014.  
E-mail: anastasya.vesnina@mail.ru

Received 28 July 2023; accepted  
02 November 2023.

### Abstract

The effectiveness of upper cervical sympathectomy in the treatment of patients with neurovascular pathology has been discussed in the researcher's article for many years. However, the indications for this surgery need still to be clarified. The dynamics of cerebral blood flow during sympathetic blockade could not become the significant criterion for determining indications for surgical treatment. A cerebral perfusion pressure change in neurovascular pathology can activate the neurogenic mechanism of cerebral blood flow regulation. The need to search for new methods for the intensity of the autonomic nervous system impact on the cerebral vessels tone (the neurogenic mechanism of cerebral blood flow regulation) to clarify the indications for upper cervical sympathectomy in patients with neurovascular pathology is justified. The review put forward a hypothesis about the relationship between intracranial B-waves amplitude and the state of the neurogenic mechanism of cerebral blood flow regulation.

**Key words:** cerebral blood flow regulation, cerebral perfusion pressure, intracranial B-waves, neurogenic mechanism, sympathetic ganglion blockade, upper cervical sympathectomy.

*For citation: Vesnina AA, Samochnykh KA, Semenyutin VB. Upper cervical sympathectomy in neurovascular pathology. Translyatsionnaya meditsina=Translational Medicine. 2023;10(6):581-590 (In Russ.) DOI: 10.18705/2311-4495-2023-10-6-581-590. EDN: PLFQUI*

### Введение

Цереброваскулярная болезнь остается одной из основных причин смертности во всем мире. Заболеваемость острыми нарушениями мозгового кровообращения составляет 10,3 млн случаев в год [1]. В России ишемические инсульты по частоте инвалидизации занимают второе место среди всех причин [2], а в структуре общей смертности — второе место как в России, так и в мире [3].

Среди причин нарушения церебральной гемодинамики важное место занимает окклюзия брахиоцефальных артерий. Риск возникновения ишемического события у пациентов с окклюзией сонной артерии составляет 5,5 % с ежегодным

уровнем смертности от острых нарушений мозгового кровообращения до 8,9 % [4].

Учитывая неудовлетворенность результатами медикаментозного лечения (проведение консервативной терапии является бесперспективным у половины пациентов с диагностированной окклюзией брахиоцефальных артерий), некоторые авторы предлагают улучшить церебральную перфузию хирургическим путем [5-7]. В Национальных рекомендациях по ведению пациентов с заболеваниями брахиоцефальных артерий от 2013 года «основной операцией при развитии окклюзии внутренней сонной артерии должно быть выполнение экстра-интракраниального микроанасто-

мозга» [8]. Второй рекомендованной операцией является каротидная экстернопластика — резекция внутренней сонной артерии с периартериальной симпатэктомией, эндартерэктомией устья наружной сонной артерии для улучшения функционирования естественных коллатералей при сочетании окклюзии внутренней сонной артерии со стенозом наружной. Однако реваскуляризации подвергаются только 5-12 % больных. При отсутствии показаний к проведению прямых реваскуляризирующих операций на брахиоцефальных артериях некоторые авторы предлагают использовать верхнешейную симпатэктомию [9-11].

Авторы предполагают, что верхнешейная симпатэктомиа ликвидирует состояние артериально-го гипертонуса, прерывая сосудосуживающие импульсы, передающиеся по симпатическим нервам, и обеспечивая максимальную дилатацию артерий малого калибра и артериол, усиление микроциркуляции, уменьшение периферического сопротивления кровотоку [9]. В то же время верхнешейная симпатэктомиа до сих пор не представлена в рекомендациях по тактике ведения пациентов с заболеваниями брахиоцефальных артерий по причине противоречивых клинических результатов. Таким образом, для повышения эффективности оперативных вмешательств становится очевидной необходимость патогенетически обоснованного определения показаний к проведению верхнешейной симпатэктомии у данной группы больных с целью улучшения исходов оперативного лечения.

### Материалы и методы

Сбор информации осуществляли с помощью баз данных PubMed, Elibrary.ru и Elsevier, анализировали статьи по шейной симпатэктомии, блокаде шейного симпатического ганглия, регуляции мозгового кровотока по май 2023 года включительно.

### Результаты и обсуждение

#### *Влияние блокады симпатического ганглия на мозговой кровоток*

Нейрогенное воздействие на церебральный кровоток и его участие в ауторегуляции исследуется с начала XX века. Первые доказательства констрикции сосудов головного мозга у животных под воздействием симпатической стимуляции на шейном уровне получили экспериментальным путем Н. Forbes и Н. Wolff в 1928 году [12]. R. Leriche и R. Fontaine (1936 г.) [13] обратили внимание на то, что блокада звездчатого ганглия вызывает «паразитический регресс симптомов в двух случаях послеоперационной гемиплегии». Позже R. Leriche (1952 г.) [14] опубликовал несколько

случаев применения блокады звездчатого ганглия для лечения больных с ишемией головного мозга. Автор показал положительную динамику в неврологическом статусе после курса медикаментозных симпатических блокад и выдвинул предположение, что регресс неврологической симптоматики связан с увеличением мозгового кровотока.

Для подтверждения этой гипотезы и оценки динамики мозгового кровотока при выполнении симпатической блокады некоторые авторы применяли метод S. Kety, C. Schmidt (1948 г.) [15], однако полученные результаты оказались противоречивы. Если M. Harmel и соавторы (1949 г.) [16] при выполнении двусторонней блокады звездчатых ганглиев пациентам с различными заболеваниями, среди которых были черепно-мозговая травма, гипертоническая болезнь, болезнь Паркинсона и др., не выявили достоверных изменений мозгового кровотока и церебрального сосудистого сопротивления, то Н. Shenkin и коллеги (1951 г.) [17] и L. Linden и соавторы (1955 г.) [18] при оценке мозгового кровотока у больных с атеросклерозом сосудов головного мозга и последствиями нарушений мозгового кровообращения при проведении шейной симпатической блокады получили достоверное снижение периферического сопротивления. Из-за неоднозначности результатов возникла необходимость в поиске другого метода оценки мозгового кровотока.

M. Treggiari и коллеги (2003 г.) [19] оценивали влияние блокады верхнего шейного ганглия на динамику мозгового кровотока в остром периоде аневризматического кровоизлияния по данным церебральной ангиографии у 9 пациентов. У всех больных было отмечено улучшение перфузии, у 7 из 9 — клиническое улучшение. Авторы пришли к выводу, что шейная симпатическая блокада эффективна для улучшения церебральной перфузии и приводит к устранению симптомов отсроченного ишемического дефицита.

M. Gupta и коллеги (2005 г.) [20] изучали динамику мозгового кровотока по данным ультразвуковой доплерографии, состояния ауторегуляции мозгового кровотока при помощи компрессионного теста и CO<sub>2</sub>-реактивности у 20 больных с травмой плечевого сплетения при проведении блокады звездчатого ганглия. Авторы показали достоверное снижение линейной скорости кровотока в ипсилатеральной средней мозговой артерии с 61 (53–67) до 55 (46–60) см/с, увеличение расчетного показателя церебрального перфузионного давления с 59 (51–67) до 70 (60–78) мм рт. ст. и снижение нулевого давления потока с 32 (26–39) до 25 (16–30) мм рт. ст. — показателя тонуса сосудов головного

мозга. Показатели  $\text{CO}_2$ -реактивности и церебральной ауторегуляции не изменились. Снижение линейной скорости кровотока в ипсилатеральной средней мозговой артерии авторы объяснили возможным увеличением ее диаметра.

V. Jain и коллеги (2011 г.) [21] проводили медикаментозную блокаду звездчатого ганглия 15 пациентам с целью лечения вазоспазма. В исследование были включены больные, у которых после аневризматического кровоизлияния развивались клинические симптомы вазоспазма, линейная скорость кровотока в передней или средней мозговой артериях повышалась выше 120 см/с, а консервативная терапия была неэффективна в течение 24 часов. Учитывая представленные показатели линейной скорости кровотока, все включенные пациенты переносили вазоспазм легкой степени. Через 6 часов после блокады было отмечено значимое снижение линейной скорости кровотока в ипсилатеральной средней мозговой артерии, а через 12 часов — в контрлатеральной и обеих передних мозговых артериях у всех пациентов. Динамику линейной скорости кровотока авторы объяснили возможным снижением тонуса интракраниальных артерий под перекрестным действием симпатических волокон и увеличением перфузионного давления. Уменьшение неврологического дефицита было отмечено у 11 из 15 больных.

S. Ohta и соавторы (1990 г.) [22] проводили блокаду звездчатого ганглия 16 пациентам с глухотой. С помощью радиоизотопного метода было показано отсутствие изменения мозгового кровотока ( $50,4 \pm 8,4$  и  $49,0 \pm 5,9$  мл/100г/мин — до и после блокады соответственно) через 20 минут после проведения односторонней блокады.

С.-К. Kang и коллеги (2010 г.) [23] оценивали динамику мозгового кровотока при проведении блокады звездчатого ганглия у 19 здоровых добровольцев посредством магнитно-резонансной ангиографии. Через 10 минут после проведения блокады отмечено достоверное усиление интенсивности МР-сигнала по наружной сонной, поверхностной височной, затылочной и глазничной артериям с ипсилатеральной стороны. В ипсилатеральной средней мозговой, а также ипси- и контрлатеральной задних мозговых артериях интенсивность МР-сигнала достоверно снижалась. Получено значимое увеличение диаметра ипсилатеральной наружной сонной артерии. Авторы предположили, что данный эффект может быть обусловлен различным действием симпатической нервной системы на экстра- и интракраниальные артерии. Однако изменение диаметра интракраниальных артерий не было значительным ( $-3,3 \pm 1,1$  % в ип-

силатеральной средней мозговой артерии;  $-2,6 \pm 1,1$  % и  $-2,1 \pm 0,7$  % в ипси- и контрлатеральной задней мозговой артерии соответственно) при сравнении с нарастанием диаметра экстракраниальных артерий ( $+26,5 \pm 1,5$  % в ипсилатеральной наружной сонной артерии).

Таким образом, были получены противоречивые результаты влияния блокады шейного симпатического ганглия на мозговой кровоток. Часть авторов отмечали в динамике улучшение церебральной перфузии [19–21], некоторые — снижение [23] или отсутствие эффекта [22]. При этом улучшение неврологического статуса при увеличении мозгового кровотока отмечено только у части пациентов [19, 21]. P. Brassard и коллеги (2017 г.) [24], пытаясь понять причины противоречий в исследованиях симпатической регуляции мозгового кровотока, критически проанализировали доступные методы исследования мозгового кровотока и нашли ограничения в применении каждого из них. Удобство транскраниальной доплерографии, инфракрасной спектроскопии и лазерной флоуметрии заключается в их портативности, неинвазивности и способности получать непрерывные данные. Однако авторы отмечают, что при использовании транскраниальной доплерографии нельзя исключить влияние симпатической блокады на диаметр артерии, в которой производилось измерение линейной скорости кровотока. Два других метода имеют большое количество внешних помех и артефактов движения.

M. ter Laan и соавторы (2013 г.) [25] приходят к выводу, что симпатический тонус предотвращает увеличение мозгового кровотока при артериальной гипертензии, гипоксии и гиперкапнии, а симпатическую активность можно рассматривать как модулятор церебральной ауторегуляции, определяющий динамику мозгового кровотока под воздействием системной гемодинамики, и это может быть использовано в лечении ишемии головного мозга, когда симпатический тонус повышен. Основные причины противоречивых результатов исследований авторы статьи нашли в видовых различиях распределения адренергических рецепторов, использовании трудоемких методов измерения церебрального кровотока, различной проницаемости гематоэнцефалического барьера в экспериментальных условиях, смешении ауторегуляторных механизмов. Одну из причин неоднозначных результатов авторы видят в проведении симпатической блокады путем чрескожной инфльтрации анестетика, что, по их мнению, может говорить о недостоверности результатов, в связи с возможностью неполной симпатической бло-

кады. Эти противоречия могли разрешиться при полном хирургическом удалении симпатического ганглия.

### **Шейная симпатэктомия**

Эффективность шейной симпатэктомии исследовалась в экспериментальных работах. E. Alborch коллеги (1977 г.) [26] по результатам верхней симпатэктомии у коз отметили, что после операции наблюдается постепенное увеличение мозгового кровотока в течение двух дней в среднем на 66 % (от 25 до 106 %), но с постепенным регрессом изменений и достижением контрольных значений через 15–25 дней. Мозговой кровотоки оценивали при помощи электромагнитной флоуметрии с магистральной установкой датчика. В это же время оценивался эффект введения  $\alpha$ - и  $\beta$ -адреноблокаторов (их эффект был значительно ослаблен после проведения симпатэктомии), что в данном исследовании подтвердило наличие симпатического тонуса мозговых сосудов.

R. Lee и соавторы (2017 г.) [27] по данным гистологического исследования сосудов головного мозга крыс показали, что двусторонняя преганглионарная симпатэктомия способствует поддержанию церебральной перфузии при асфиксической остановке сердца. Снижение мозгового кровотока у оперированных животных составило  $20,0 \pm 8,99$  %, в то время как в контрольной группе —  $33,2 \pm 2,65$  %. Количество неповрежденных нейронов также преобладало в группе животных с выполненной двусторонней симпатэктомией ( $1\ 128 \pm 13$  против  $527 \pm 19$  у контрольной группы).

Ряд авторов [28–30], оценивая влияние шейной ганглиоэктомии у животных на церебральный кровоток по методам Kety и Schmidt, радиоактивных микросфер, не отметили значимой динамики мозгового кровотока. При этом J. Igloffstein и коллеги (1983 г.) [30] показали, что у крыс, с предварительно выполненной преганглионарной шейной симпатэктомией, после проведения перевязки общей сонной артерии частота развития инфарктов головного мозга выше, чем у контрольной группы. Дополнительная перевязка наружной сонной артерии в отдельной группе приводила к выявлению более обширной зоны ишемических изменений мозга. Авторы объяснили полученные результаты преобладанием расширения экстракраниальных артерий и эффектом обкрадывания.

Итак, результаты экспериментальных работ по оценке влияния шейной симпатэктомии на мозговой кровотоки как показатель возможной эффективности вмешательства были также противоречивы. Вместе с тем, сохранялась актуальность

проблемы лечения пациентов с ишемией головного мозга, по этой причине ряд авторов применяют верхнешейную симпатэктомию при различной патологии сосудов головного мозга.

A. de S. Pereira (1955 г.) [31] при проведении билатеральной шейной симпатэктомии для лечения 31 пациента с тромбозом внутренней сонной артерии отметил клиническое улучшение в виде частичного или полного регресса гемипареза и афазии у 22 больных, которое сопровождалось усилением мозгового кровотока по данным контрольной церебральной ангиографии.

J. Suzuki с соавторами (1975 г.) [32], используя дигитальную ангиографию для оценки мозгового кровотока, в 11 случаях применения верхнешейной симпатэктомии для лечения вазоспазма установили, что это способствует увеличению диаметра спазмированных артерий. В 9 случаях из 11 авторы отметили клиническое улучшение у пролеченных пациентов в виде регресса афазии, гемипареза, а также нарастания уровня сознания.

J. Jeng и коллеги (1999 г.) [33] после проведения плановой верхнегрудной симпатэктомии 68 пациентам с пальмарным гипергидрозом установили увеличение объемного кровотока в обеих внутренних сонных артериях и линейной скорости кровотока в обеих средних мозговых артериях по данным дуплексного сканирования и транскраниальной доплерографии.

Кривошапкин А. Л. с соавторами (2008 г.) [10] оценивали состояние церебральной гемодинамики при помощи транскраниальной доплерографии и церебральной ангиографии при проведении радиочастотной термодеструкции звездчатого узла на уровне С6–С7 позвонков у 13 пациентов с вазоспазмом, развившимся на фоне аневризматического кровоизлияния (легкой степени — 4 пациента, средней — 6, тяжелой — 3). В результате у всех больных через 24–48 часов после операции было отмечено снижение линейной скорости кровотока в средней мозговой артерии и индекса Линдегаарда (при легкой степени с  $2,80 \pm 0,02$  до  $1,9 \pm 0,15$ ; средней — с  $4,09 \pm 0,78$  до  $1,9 \pm 0,16$ ; тяжелой — с  $6,70 \pm 0,26$  до  $3,5 \pm 0,75$ ).

Леменев В. Л. и коллеги (2011 г.) [11] применяли шейную симпатэктомию для лечения 73 пациентов с проявлениями вертебробазилярной недостаточности и нарушением венозного оттока, которым невозможно было провести реконструктивную операцию на сосудах при диагностированном окклюзирующем поражении (различной этиологии) внутренней сонной и/или позвоночной артерии. В предоперационном периоде всем пациентам проводили дуплексное сканирование

и радиоизотопную ангиосцинтиграфию головного мозга. В послеоперационном периоде у всех больных выявлен регресс общемозговой симптоматики, кохлеовестибулярных нарушений, стволовых, мозжечковых и корковых выпадений. Инструментальное обследование пациентов в послеоперационном периоде проводилось выборочно: 11 больным выполнено дуплексное сканирование позвоночных артерий (отмечено увеличение объемного кровотока), 66 — радиоизотопная ангиосцинтиграфия (у 64 отмечено уменьшение степени редукции мозгового кровотока). Авторы пришли к выводу, что шейная симпатэктомия может быть эффективным методом лечения ишемии головного мозга различного генеза.

Таким образом, несмотря на выявленное увеличение мозгового кровотока у пациентов после проведения шейной симпатэктомии, клинический результат был достигнут только у части больных. При этом экспериментальные работы не смогли установить, как симпатэктомия влияет на мозговой кровоток. Учитывая вышесказанное, отсутствие однозначных выводов исследователей может быть связано с тем, что в основе определения показаний к шейной симпатэктомии лежит оценка динамики мозгового кровотока. Решение данной проблемы может быть в поиске нового критерия для определения показаний к операции. Снижение церебрального перфузионного давления в условиях развития цереброваскулярного заболевания активирует нейрогенный механизм регуляции мозгового кровотока. Активацию нейрогенного компонента регуляции можно рассматривать как прогностический критерий результата проведения верхнешейной симпатэктомии. По этой причине новым подходом при определении показаний к оперативному вмешательству может стать оценка степени воздействия симпатической системы на тонус церебральных сосудов.

#### ***Вазомоторная роль верхнего шейного симпатического ганглия***

Установлено, что сосудистая сеть головного мозга иннервируется симпатическими, парасимпатическими и чувствительными нервными волокнами, при этом в пиальных артериях преобладает периферическая иннервация (верхний шейный и тройничный ганглии), а в паренхиматозных — центральная (подкорковые ганглии) [34]. Угрюмов В. М. и соавторы (1984 г.) [35] при изучении проблемы регулирования мозгового кровотока, особенно вазомоторной роли верхнего шейного симпатического ганглия, показали, что при раздражении шейного симпатического

нерва кривая ауторегуляции сдвигается вправо, а флюоресценция нервных волокон пиальных артерий и коллатералей к мягкой мозговой оболочке исчезает после двусторонней симпатэктомии. Теплов С. И. (1980 г.) [36], обобщив все полученные знания в области нейрогенной регуляции кровоснабжения головного мозга, утверждал, что «возбуждение симпатической нервной системы помогает ауторегуляторной вазоконстрикции при повышении системного давления, но мешает полностью проявиться ауторегуляторной дилатации». В настоящее время среди множества гипотез о роли нейрогенного компонента регуляции мозгового кровотока наиболее убедительным является вывод о том, что симпатическая нервная система защищает головной мозг от гиперперфузии во время кратковременного повышения артериального давления [34].

Отражением нейрогенной вазогенной активности, по мнению ряда авторов, могут являться внутричерепные В-волны [37-40]. Исследователи отмечали повышение амплитуды В-волн внутричерепного давления при снижении церебрального перфузионного давления у пациентов с черепно-мозговой травмой, гидроцефалией и вазоспазмом вследствие аневризматического кровоизлияния.

I. Martinez-Tejada и соавторы (2019 г.) [41] выделили важные характеристики медленноволновых колебаний внутричерепного давления: частота, амплитуда, форма и наличие фазы «плато», на основе которых их классифицирует большая часть исследователей. Авторы определили В-волны как колебания внутричерепного давления с амплитудой до 50 мм рт. ст. и частотой от 0.5 до 2 волн в минуту, выделили два их типа: рамповые и синусоидальные волны. Причем последние подразделяются на высокоамплитудные (> 10 мм рт. ст.) и низкоамплитудные (< 10 мм рт. ст.).

При сопоставлении колебаний линейной скорости в артериях основания мозга и внутричерепного давления авторами были показаны их корреляция и идентичность [42-44]. Это сделало возможным неинвазивный мониторинг В-волн с помощью спектрального анализа линейной скорости кровотока в артериях основания мозга.

По результатам спектрального анализа линейной скорости кровотока в афферентных сосудах артериовенозных мальформаций головного мозга до и после эмболизации некоторыми авторами было высказано предположение, что повышение амплитуды В-волн связано с дополнительной нейрогенной дилатацией пиальных артерий при низком перфузионном давлении [45].

Н. Schytz и коллеги (2010 г.) [46] обобщили работы, в которых авторы отмечали наличие спонтанных колебаний линейной скорости кровотока в низкочастотном спектре (ниже 0,04 Гц) у пациентов со стено-окклюзивными заболеваниями и показали их связь с нарушением церебральной ауторегуляции (по данным кросс-спектрального анализа). Авторами были рассмотрены различные механизмы возникновения колебаний: первый — миогенный, как сосудистая реакция на колебания артериального давления, второй — вследствие действия центрального пейсмейкера. Была подчеркнута необходимость клинических исследований для выяснения этиологии низкочастотных колебаний линейной скорости кровотока.

Итак, наличие внутричерепных В-волн было показано у пациентов с различной нейрохирургической патологией, в том числе у больных со стено-окклюзивными заболеваниями [37–40, 46]. Учитывая, что повышение амплитуды В-волн отмечали при снижении церебральной перфузионного давления, можно предположить, что интенсивность внутричерепных В-волн связана с функциональным состоянием симпатической нервной системы.

### Заключение

Таким образом, была показана перспективность верхнешейной симпатэктомии у пациентов с невровакулярной патологией при снижении церебральной перфузии. Однако анализ периоперационной динамики мозгового кровотока не позволил исследователям разработать клинические рекомендации по проведению вмешательства у данной категории больных. По этой причине возникает необходимость в поиске дополнительных критериев для уточнения показаний к верхнешейной симпатэктомии. Перспективной может стать неинвазивная оценка функционального состояния нейрогенного механизма регуляции мозгового кровотока у больных, одним из проявлений которого, по-видимому, является интенсивность внутричерепных В-волн.

### Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциально-го конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

### Финансирование / Funding

Средства государственного задания Минздрава России № 056-00017-23-00 (на 2023 г. и на плановый период 2024 и 2025 гг.); тема: «Разработка малоинвазивной системы непрерывной оценки био-

механических свойств краниоспинальной системы ликворообращения и корковой перфузии»; ЕГИСУ НИОКТР: 121031100314-1. / Funds of the state task of the Ministry of Health of the Russian Federation No. 056-00017-23-00 (for 2023 and for the planning period 2024 and 2025); topic: «Development of a minimally invasive system for continuous assessment of the biomechanical properties of the craniospinal fluid circulation system and cortical perfusion»; EGISU R&D: 121031100314-1.

### Список литературы / References

1. GBD 2015 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*. 2016; 388(10053):1545-1602. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)31678-6. PMID: 27733282; PMCID: PMC5055577.
2. Dymochka MA, Krasnovskaya ES, Verigina NB. Regularities of the formation of disability of the adult population. FSBI FB ITU Ministry of Labor of Russia, Moscow, 2020. In Russian [Дымочка М.А., Красновская Е.С., Веригина Н.Б. Закономерности формирования инвалидности взрослого населения. ФГБУ ФБ МСЭ Минтруда России, Москва, 2020].
3. Natural movement of the population of the Russian Federation. Federal State Statistics Service, Moscow, 2021. In Russian [Естественное движение населения Российской Федерации. Федеральная служба государственной статистики, Москва, 2021].
4. Myrcha P, Gloviczki P. A systematic review of endovascular treatment for chronic total occlusion of the internal carotid artery. *Annals of Translational Medicine*. 2021; 9(14):1203. DOI: 10.21037/atm-20-6980. PMID: 34430644; PMCID: PMC8350681.
5. Ogasawara K, Ogawa A. [JET study (Japanese EC-IC Bypass Trial)]. *Nichon Rinsho*. 2006; 64(7):524-7. PMID:17461199.
6. Powers WJ, Clarke WR, Grubb RL Jr, et al. COSS Investigators. Extracranial-intracranial bypass surgery for stroke prevention in hemodynamic cerebral ischemia: the Carotid Occlusion Surgery Study randomized trial. *JAMA*. 2011; 306(18):1983-92. DOI: 10.1001/jama.2011.1610. PMID: 22068990; PMCID: PMC3601825.
7. Xu B, Li C, Guo Y, et al. Current understanding of chronic total occlusion of the internal carotid artery. *Biomedical Reports*. 2018;8(2):117-125. DOI: 10.3892/br.2017.1033. PMID: 29435269; PMCID: PMC5776422.
8. Russian Society of Angiologists and Vascular Surgeons, Association of Cardiovascular Surgeons of Russia, Russian Scientific Society of X-Ray Endovascular Surgeons and Interventional Radiologists, All-Russian Scientific Society of Cardiologists, Association of Phlebologists of

Russia. National guidelines for the management of patients with diseases of the brachiocephalic arteries. Moscow, 2013. In Russian [Российское общество ангиологов и сосудистых хирургов, Ассоциация сердечно-сосудистых хирургов России, Российское научное общество рентгенэндоваскулярных хирургов и интервенционных радиологов, Всероссийское научное общество кардиологов, Ассоциация флебологов России. Национальные рекомендации по ведению пациентов с заболеваниями брахиоцефальных артерий. Москва, 2013].

9. Doi S, Cho N, Obara T. Stellate ganglion block increases blood flow in the anastomotic artery after superficial temporal artery-middle cerebral artery bypass. *British journal of anaesthesia*. 2016; 117(3):395-6. DOI: 10.1093/bja/aew230. PMID: 27543535.

10. Krivoshapkin AL, Dujshobaev AR, Melidi EG, et al. Radiofrequency thermal destruction of the cervical sympathetic node in order to resolve angiospasm in subarachnoid aneurysmal hemorrhage. *Bulletin of Siberian medicine*. 2008;7(5-1):204-207. In Russian [Кривошапкин А.Л., Дуйшобаев А.Р., Мелиди Е.Г. и др. Радиочастотная термодеструкция шейного, симпатического узла с целью разрешения ангиоспазма при субарахноидальном аневризматическом кровоизлиянии. Бюллетень сибирской медицины. 2008;7(5-1): 204-207].

11. Lemenev VL, Aslanyan LS, Akhmetov VV, et al. Cervical sympathectomy in the treatment of patients with cerebral ischemia. *Nejrokhirurgiya=Neurosurgery*. 2011;1:66-70. In Russian [Леманев В.Л., Асланян Л.С., Ахметов В.В. и др. Шейная симпатэктомия в лечении больных с ишемией головного мозга. Нейрохирургия. 2011;1:66-70].

12. Forbes HS, Wolff HG. Cerebral circulation: III. The vasomotor control of cerebral vessels. *Journal of Nervous and Mental Disease*. 1928;19:1057-1086. DOI:10.1001/ARC.HNEURPSYC.1928.02210120090008.

13. Leriche R, Fontaine R. Infiltrations stellaires dans l'embolies cérébrales dans les spasmes vasculaires post-opératoires de l'encephale et chez les hémiplegiques. *Rev de Chir*. 1936;74:755-758.

14. Leriche R. Treatment of embolism and thrombosis of the cerebral vessels. *British medical journal*. 1952; 1:231-235. DOI:10.1136/bmj.1.4752.231.

15. Kety SS, Schmidt CF. The nitrous oxide method for the quantitative determination of cerebral blood flow in man: theory, procedure and normal values. *The Journal of Clinical Investigation*. 1948;27(4):476-83. DOI: 10.1172/JCI101994. PMID: 16695568; PMCID: PMC439518.

16. Harmel MH, Hafkenschiel JH, Austin GM, et al. The effect of bilateral stellate ganglion block on the cerebral circulation in normotensive and hypertensive patients. *The Journal of Clinical Investigation*. 1949;28(3):415-8. DOI: 10.1172/JCI102085. PMID: 16695692; PMCID: PMC439616.

17. Shenkin HA, Cabieses F, Van Den Noordt G. The effect of bilateral stellectomy upon the cerebral circulation

of man. *The Journal of Clinical Investigation*. 1951;30(1):90-3. DOI: 10.1172/JCI102421. PMID: 14803562; PMCID: PMC436232.

18. Linden L. The effect of stellate ganglion block on cerebral circulation in cerebrovascular accidents. *Acta Medica Scandinavica*. 1955;301:1-110. DOI: 10.1590/S0004-282X1956000100008. PMID: 14375827.

19. Treggiari MM, Romand J-A, Martin J-B, et al. Cervical sympathetic block to reverse delayed ischemic neurological deficits after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke*. 2003; 34:961-967. DOI: 10.1161/01.STR.0000060893.72098.80. PMID: 12649526.

20. Gupta MM, Bithal PK, Dash HH, et al. Effects of stellate ganglion block on cerebral haemodynamics as assessed by transcranial Doppler ultrasonography. *British Journal of Anaesthesia*. 2005; 95(5):669-73. DOI: 10.1093/bja/aei230. PMID: 16155036.

21. Jain V, Rath GP, Dash HH, et al. Stellate ganglion block for treatment of cerebral vasospasm in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage — A preliminary study. *Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology*. 2011; 27(4):516-21. DOI: 10.4103/0970-9185.86598. PMID: 22096287; PMCID: PMC3214559.

22. Ohta S, Hadeishi H, Suzuki M. Effect of stellate ganglion block on cerebral blood flow in normoxemic and hyperoxemic states. *Journal of neurosurgical anesthesiology*. 1990;2(4):272-9. DOI: 10.1097/00008506-199012000-00004. PMID: 15815363.

23. Kang C-K, Oh S-T, Chung RK, et al. Effect of stellate ganglion block on the cerebrovascular system. *Magnetic Resonance Angiography Study*. *Anesthesiology*. 2010;113(4):936-44. DOI: 10.1097/ALN.0b013e3181ec63f5. PMID: 20823762.

24. Brassard P, Tymko MM, Ainslie PN. Sympathetic control of the brain circulation: Appreciating the complexities to better understand the controversy. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*. 2017;207:37-47. DOI: 10.1016/j.autneu.2017.05.003. PMID: 28506501.

25. ter Laan M, van Dijk JM, Elting JW, et al. Sympathetic regulation of cerebral blood flow in humans: a review. *British Journal of Anaesthesia*. 2013;111(3):361-7. DOI: 10.1093/bja/aet122. PMID: 23616589.

26. Alborch E, Gomez B, Dieguez G, et al. Cerebral blood flow and vascular reactivity after removal of the superior cervical sympathetic ganglion in the goat. *Circulation Research*. 1977;41(3):278-82. DOI: 10.1161/01.res.41.3.278. PMID: 19161.

27. Lee RH, Couto E Silva A, et al. Interruption of perivascular sympathetic nerves of cerebral arteries offers neuroprotection against ischemia. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. 2017;312(1):H182-H188. DOI: 10.1152/ajpheart.00482.2016. PMID: 27864234.

28. Shackelford RT, Hegedus SA. Factors affecting cerebral blood flow. *Experimental review: sympathectomy,*

- hypothermia, CO<sub>2</sub> inhalation and pavarine. *Annals of Surgery*. 1966;163(5):771-7. DOI: 10.1097/0000658-196605000-00014. PMID: 5930460. PMCID: PMC1477179.
29. Heistad DD, Marcus ML, Gross P.M. Effects of sympathetic nerves on cerebral vessels in dog, cat, and monkey. *American Journal of Physiology*. 1978;235(5):H544-52. DOI: 10.1152/ajpheart.1978.235.5.H544. PMID: 103441.
30. Igloffstein J, Laas R. Cerebral infarction due to carotid occlusion and carbon monoxide exposure. II. Influence of preganglionic cervical sympathectomy. *Journal of neurology, neurosurgery and psychiatry*. 1983;46(8):768-73. DOI: 10.1136/jnnp.46.8.768. PMID: 6886721; PMCID: PMC1027532.
31. Pereira A de S. Surgical treatment of internal carotid thrombosis. *Annals of Surgery*. 1955; 141(2):218-33. DOI: 10.1097/0000658-195502000-00007. PMID: 13229256, PMCID: PMC1609777.
32. Suzuki J, Iwabuchi T, Hori S. Cervical sympathectomy for cerebral vasospasm after aneurysm rupture. *Neurologia Medico-Chirurgica (Tokyo)*. 1975;15pt1:41-50. DOI: 10.2176/nmc.15pt1.41. PMID: 60719.
33. Jeng JS, Yip PK, Huang SJ, et al. Changes in hemodynamics of the carotid and middle cerebral arteries before and after endoscopic sympathectomy in patients with palmar hyperhidrosis: preliminary results. *Journal of Neurosurgery*. 1999;90(3):463-7. DOI: 10.3171/jns.1999.90.3.0463. PMID: 10067914.
34. Fan JL, Brassard P, Rickards CA, et al. Integrative cerebral blood flow regulation in ischemic stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow Metabolism*. 2022;42(3):387-403. DOI: 10.1177/0271678X211032029. PMID: 34259070; PMCID: PMC8985438.
35. Ugryumov VM, Teplov SI, Tigliev GS. Regulation of cerebral circulation. L.: Medicina, 1984. In Russian [Угрюмов В.М., Теплов С.И., Тиглиев Г.С. Регуляция мозгового кровообращения. Л.: Медицина, 1984].
36. Teplov SI. Neurogenic regulation of blood supply to the heart and brain. L.: Nauka, 1980. In Russian [Теплов С.И. Нейрогенная регуляция кровоснабжения сердца и головного мозга. Л.: Наука, 1980].
37. Balestreri M, Czosnyka M, Steiner LA, et al. Intracranial hypertension: what additional information can be derived from ICP waveform after head injury? *Acta Neurochirurgica*. 2004;146(2):131-41. DOI: 10.1007/s00701-003-0187-y. PMID: 14963745.
38. Hayashi M, Kobayashi H, Kawano H, et al. Cerebral blood flow and ICP patterns in patients with communicating hydrocephalus after aneurysm rupture. *Journal of neurosurgery*. 1984;61(1):30-6. DOI: 10.3171/jns.1984.61.1.0030. PMID: 6726408.
39. Lalou DA, Donnelly J, Czosnyka M, et al. Are B waves of intracranial pressure suppressed by general anesthesia? *Fluids and Barriers of the CNS*. 2018;126:129-132. DOI: 10.1007/978-3-319-65798-1\_27. PMID: 29492547.
40. Momjian S, Czosnyka Z, Czosnyka M, et al. Link between vasogenic waves of intracranial pressure and cerebrospinal fluid outflow resistance in normal pressure hydrocephalus. *British Journal of Neurosurgery*. 2004;18(1):56-61. DOI: 10.1080/02688690410001660481. PMID: 15040716.
41. MartinezTejada I, Arum A, Wilhjelm JE, et al. B waves: a systematic review of terminology, characteristics, and analysis methods. *Fluids and Barriers of the CNS*. 2019;16(1):33. DOI: 10.1186/s12987-019-0153-6. PMID: 31610775; PMCID: PMC6792201.
42. Newell DW, Aaslid R, Stooss R, et al. The relationship of blood flow velocity fluctuations to intracranial pressure B waves. *Journal of Neurosurgery*. 1992;76(3):415-21. DOI: 10.3171/jns.1992.76.3.0415. PMID: 1738020.
43. Cardim D, Schmidt B, Robba C, et al. Transcranial Doppler monitoring of intracranial pressure plateau waves. *Neurocritical Care*. 2016; 25(3):473-491. DOI: 10.1007/s12028-016-0258-6. PMID: 26940914; PMCID: PMC5138275.
44. Newell DW, Maiken N, Aaslid R. Physiological Mechanisms and Significance of Intracranial B Waves. *Frontiers in Neurology*. 2022; 13:872701. DOI: 10.3389/fneur.2022.872701. PMID: 35651339; PMCID: PMC9149212.
45. Semenyutin V, Aliev V, Panuntsev G, et al. Perioperative Dynamics of Intracranial B-waves of Blood Flow Velocity in the Basal Cerebral Arteries in Patients with Brain Arteriovenous Malformation. *Acta Neurochirurgica Supplement*. 2021;131:63-68. DOI: 10.1007/978-3-030-59436-7\_14.
46. Schytz HW, Hansson A, Phillip D, et al. Spontaneous low-frequency oscillations in cerebral vessels: applications in carotid artery disease and ischemic stroke. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*. 2010; 19(6):465-74. DOI: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2010.06.001. PMID: 20864356; PMCID: PMC3752675.

#### Информация об авторах:

Веснина Анастасия Андреевна, младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории патологии мозгового кровообращения, РНХИ им. проф. А. Л. Поленова — филиал ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Самочерных Константин Александрович, д.м.н., профессор РАН, директор РНХИ им. проф. А. Л. Поленова — филиала ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Семенютин Владимир Борисович, д.б.н., профессор, заведующий научно-исследовательской лабораторией патологии мозгового кровообращения, РНХИ им. проф. А. Л. Поленова — филиал ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России.

**Authors information:**

Anastasiia A. Vesnina, Junior researcher of the Research Laboratory of Cerebral Circulation Pathology, Polenov Russian Scientific Research Institute of Neurosurgery — branch of the Almazov National Medical Research Centre;

Konstantin A. Samochernykh, Doctor of Medical Sciences, Professor of the Russian Academy of Science, Director of the Polenov Russian Scientific Research Institute of Neurosurgery — branch of the Almazov National Medical Research Centre;

Vladimir B. Semenyutin, Doctor of Biological Sciences, Professor, Head of the Research Laboratory of Cerebral Circulation Pathology, Polenov Russian Scientific Research Institute of Neurosurgery — branch of the Almazov National Medical Research Centre.

## ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ АНАЛИТИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ

**Волкова Н. И., Волков А. В.**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Ростов-на-Дону, Россия

**Контактная информация:**  
Волкова Наталья Ивановна,  
ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России,  
Нахичеванский пер., д. 29,  
Ростов-на-Дону, Россия, 344022.  
E-mail: n\_i\_volkova@mail.ru

*Статья поступила в редакцию  
09.06.2023 и принята к печати  
26.09.2023.*

### Резюме

В статье рассмотрены противоречия в медицинской науке и практике, вызванные несоответствием между объемом накопленных знаний и методологией их освоения. Предложен методический подход к дальнейшему развитию общей теории медицины. В статье уточнены понятия объекта, предмета и метода медицины. Здоровье определено как способность организма функционировать неопределенно долго. Выявлены две формы нездоровья: болезнь и функциональная недостаточность. Болезнь определена как совокупность процессов, приводящих к потере равновесия организма и его восстановлению. Раскрыт аналитический метод диагностики заболевания. Предложено направление классификации болезней и неотложные задачи медицинской семиотики.

**Ключевые слова:** анализ, болезнь, диагноз, диагностика, качество, теоретическая медицина.

*Для цитирования: Волкова Н.И., Волков А.В. Основные понятия аналитической медицины. Трансляционная медицина. 2023;10(6):591-598. DOI: 10.18705/2311-4495-2023-10-6-591-598. EDN: PWSNBF*

## BASIC CONCEPTS OF ANALYTICAL MEDICINE

Natalya I. Volkova, Andrey V. Volkov

Rostov State Medical University, Russia, Rostov-on-Don

Corresponding author:

Natalya I. Volkova,  
Rostov State Medical University,  
Nahichevansky ave., 29, Rostov-on-Don,  
Russia, 344022.  
E-mail: n\_i\_volkova@mail.ru

Received 9 June 2023; accepted  
26 September 2023.

### Abstract

The article discusses the contradictions in medical science and practice caused by the discrepancy between the amount of knowledge and the methodology for their development. The proposed methodological approach to the development of the general theory of medicine. The article clarifies the concepts of objects, subject and methods of medicine. Health is defined as the body's ability to make up indefinitely. Two forms of ill-health have been identified: illness and functional insufficiency. The disease is defined as a set of processes leading to the loss of signs of the organism and its consequences. Disclose the results of the diagnosis of diseases. The direction of detection of diseases and urgent tasks of medical semiotics are provided.

**Key words:** analysis, diagnosis, disease, quality, theoretical medicine.

*For citation: Volkova NI, Volkov AV. Basic concepts of analytical medicine. Translyatsionnaya medicina=Translational Medicine. 2023;10(6):591-598 (In Russ.) DOI: 10.18705/2311-4495-2023-10-6-591-598. EDN: PWSNBF*

### 1. Предпосылки аналитической медицины

Начиная с конца XIX века и по настоящее время медицина переживает этап бурного развития, в связи с чем в XX веке в развитых странах значительно увеличилась продолжительность жизни населения, в том числе продолжительность здоровой жизни [1].

Успехи медицинской науки во многом были обусловлены широким вовлечением в ее оборот достижений смежных наук: физиологии, микробиологии, цитологии, химии, генетики и др. Медицина, которая в течение тысячелетий, фактически до конца XIX века, развивалась в рамках своих собственных, специфических, устоявшихся, мало меняющихся со временем методов и теорий, получив от смежных наук новые познавательные инструменты, иные теоретические подходы, вступила в период бурного роста знаний, как по объему, так и по качеству. Если в начале XX века было известно несколько сотен болезней, то в настоящее

время — тысячи, количество симптомов возросло также с сотен до тысяч. Аналогично расширились списки лекарственных препаратов. Помимо такого гигантского роста количественных показателей знаний, произошло коренное качественное их изменение: появилось понимание патогенеза большинства заболеваний на молекулярном уровне, раскрыто строение, механизмы функционирования, биохимия большинства органов, клеточных систем организма человека. Все это позволило глубже и тоньше понимать проблемы нездоровья человека и улучшить работу с этим нездоровьем.

Однако другой стороной такого колоссального нарастания объема медицинских знаний явились ярко проявившиеся трудности в их использовании. Совершенно очевидно, что ни один врач, ни один ученый-медик не в состоянии не только использовать в работе весь этот массив фактов, но и ориентироваться в нем. Попыткой преодолеть эти трудности стала глубокая специализация врачебных профессий. И в тех случаях, когда разделе-

ние труда в практической медицине обусловлено объективными причинами, оно дает прекрасные результаты за счет повышения эффективности и качества работы. И наоборот, там, где требуется комплексный подход к оценке состояния организма пациента (а это практически всегда необходимо при установлении диагноза заболевания, функциональной недостаточности, рисков развития болезней), разработке плана лечения, узкая квалификация врачей превращается в значительный фактор снижения эффективности и качества работы. Кроме того, совершенно очевидна искусственность сложившейся практики привлечения, как правило, нескольких узких специалистов к диагностике и лечению широко распространенных (неорфанных) заболеваний, не требующих узкоспециализированной и высокотехнологической помощи.

Результатом существующего противоречия между объемом знаний и трудностями в их использовании стали такие негативные явления, как гипердиагностика, гиперлечение, полипрагмазия, что приводит к снижению эффективности оказания медицинской помощи, росту неоправданных затрат и уменьшению ее доступности.

Кроме того, вследствие этого противоречия возникло такое парадоксальное явление, как высокий уровень врачебных ошибок в странах с развитой медициной. Данное явление стало предметом серьезных исследований начиная с середины XX века, в результате которых было установлено, что доля медицинских ошибок в лечении и диагностике в высокоразвитых странах достигает, по крайней мере, десятков процентов. При этом разработанные и предложенные меры по снижению уровня ошибок, в основном организационного, а не методологического характера, не привели к сколько-нибудь существенным результатам [2–4].

Все вышесказанное, на наш взгляд, свидетельствует о существовании в медицинской науке и практике глубокого противоречия между объемом уже накопленных и вновь генерируемых знаний и существующими методами их осмысления и интеграции в медицинскую деятельность.

С чем это связано?

Как любая наука и практическая деятельность в момент возникновения и становления, медицина в качестве основного методологического инструмента взяла на вооружение эмпирический метод познания действительности. Благодаря ему происходило первоначальное накопление фактов о здоровье и нездоровье человека, заболеваниях, методах их выявления, лечении и профилактике. Этот подход позволил выявить круг понятий, составляющих медицину, их взаимосвязи и взаи-

мообусловленности. Такого рода познавательный процесс выявления основополагающих фактов дисциплины — перевод их в понятия, определение внешних закономерностей, очерчивание границ предмета — предполагает использование такого методического подхода, как рассмотрение факта как «вещи в себе». Построенные на основе данных подходов эмпирические теории, позволяющие удовлетворительно объяснять часть довольно простых фактов, становятся весьма неэффективными при необходимости понимания сложных явлений. Дело в том, что эмпирические подходы в познавательной деятельности, рассматривающие факты действительности как «вещь в себе», ограничивают наши возможности анализа лишь внешними характеристиками наблюдаемых явлений и не позволяют реализовывать сущностный подход к изучаемой действительности. Соответственно, любые теории классификации явлений будут носить формальный, внешний характер и не дадут инструмента выявления логических связей между наблюдаемыми явлениями. Следовательно, эмпирический метод познания в науке и практике эффективен и незаменим на этапе выявления и накопления новых знаний. Дальнейшее познание действительности, с целью создания теории, раскрывающей внутренние причины возникновения и формирования наблюдаемых фактов, определение законов их развития и, соответственно, прогнозирование направления этого развития возможны лишь на основе аналитических методов.

В медицине, несмотря на отмеченный выше огромный рост знаний, до сих пор, как и в момент возникновения и становления науки, господствующим познавательным методом является эмпирический. Это выражается, в частности, в отсутствии сущностных определений таких основополагающих понятий, как человек, организм, здоровье, нездоровье, болезнь, функциональная недостаточность и т. д., что было отмечено ранее в ряде работ [5–7]. И дело здесь вовсе не в самом определении, хотя и это крайне важно, а в понимании содержания этих феноменов. Отсутствие содержательного понимания приводит, например, к таким явлениям, как классификация заболеваний по анатомическому и этиологическому принципам, то есть исходя из внешних проявлений. Конечно, подобная классификация важна и нужна, однако она не может подменить сущностной классификации болезней, в основу которой должно быть положено внутреннее содержание этого явления, тем более что лишь такой подход несет в себе познавательное значение. Вследствие этого до сих пор каждая болезнь рассматривается как «вещь в себе», «черный

ящик», и определить ее можно лишь по набору (даже не совокупности) симптомов, данных дополнительных методов исследования и т. д. Несмотря на улучшение понимания патогенеза большинства заболеваний, это не стало основанием для рассмотрения болезни как совокупности патологических и физиологических процессов.

Точно также на настоящий момент отсутствует содержательное понимание и соответствующая теория симптомов патологических состояний человека. Несмотря на огромные достижения общей семиотики, медицинская семиотика не взяла их на вооружение и не преодолела глубоко эмпирический характер существующих подходов и даже не применила методы доказательной медицины к проверке обоснованности своих положений [8].

В результате такой ситуации до сих пор господствует метод диагностики по схожести, несмотря на декларируемый подход «анализ/синтез».

Аналогичные методические трудности не позволяют врачу реализовывать подлинным образом общераспространенное требование учета индивидуальных особенностей пациента при диагностике и лечении заболевания. Требования индивидуального подхода к каждому пациенту и каждому случаю заболевания, не подкрепленные методологией реализации этого индивидуального подхода, породили гипертрофию роли «индивидуального опыта». А это, в свою очередь, вызвало большой субъективизм в медицинской науке. И если доказательная медицина пытается очистить методы лечения от его влияния, то семиотика, диагностика, оценка качества лечения и другие направления медицины до сих пор не свободны от влияния субъективизма.

## 2. Об аналитическом методе в медицине

Говоря об аналитическом методе в медицине, мы должны иметь в виду две стороны этого вопроса. Во-первых, иной, отличный от эмпирического, способ мышления. Во-вторых, особый характер теорий, описывающих действительность.

Эмпирический способ мышления предполагает в качестве единицы мыслимого конкретный факт, предмет, объект, из внешних характеристик которых составляются понятия. Последнее образуется путем нахождения общих внешних характеристик у сходных объектов, выявления общего у многого. Природа этого общего не известна.

Современное понимание болезней и способ их определения по симптомам фактически означает диагностику по «схожести», то есть отражает эмпирический подход в диагностике. Тот же метод наблюдается и при современном терапевтическом лечении, когда исходя из картины заболевания,

сходной с неким конкретным примером, ранее виденным врачом, без учета реально развернувшихся процессов, назначается то или иное терапевтическое воздействие.

В отличие от эмпирического, аналитическое мышление предполагает деконструирование конкретных объектов, явлений на их составляющие [10]. Причем деконструирование это происходит таким образом, чтобы вычленили элементы и отношения между ними, которые и определяют те или иные свойства предмета (объекта), прежде всего, сущностные. Таким образом, аналитическое мышление означает разбиение объекта на составляющие элементы и определение структуры этого объекта, то есть перевод объекта из конкретного в абстрактное, которое, собственно, и подвластно аналитическому мышлению, то есть становится объектом мышления. Причем, при таком мышлении на первом этапе происходит отбрасывание деталей, определяющих конкретный объект, а остаются элементы и структура, определяющие само явление, понятие, то есть сущностное, иными словами — мыслимая модель явления, отражающая его сущность. Аналитический способ мышления, как инструмент познания действительности, не отменяет в науке метод, но дополняет его с целью объяснить накопленные факты, выявленные закономерности. Дальнейшая задача построения модели действительности, отвечающая выявленным закономерностям и фактам, — привнесение в общую модель условий существования действительности, то есть особенностей конкретного — задача синтетического мышления.

Аналитический способ мышления, в свою очередь, обуславливает формирование аналитической теории науки. Данная теория приходит всегда на смену эмпирической и характеризуется реализацией определенной программы перестройки эмпирической теории. Она заключается в замене конкретных явлений, объектов абстрактными понятиями, моделями действительности, в установлении отношений между медицинскими моделями и моделями из смежных наук, то есть универсализации научных теорий, определением понятий и структур науки.

## 3. Аналитическая медицина

### 3.1. Объект, предмет, метод (границы науки)

Рассмотрим границы науки «аналитическая медицина». Под термином «границы науки» будем понимать объект, предмет и метод науки. Объектом медицины является человек. Под человеком, с точки зрения медицины, будем понимать явление функционирования объекта, состоящего

из онтологически и гносеологически взаимообусловленных сторон: биологической — организма и идеальной — личности.

Пояснения:

1) Под человеком понимается лишь функционирующий объект — не только живой, но и осуществляющий осознанную деятельность, то есть идеальную функцию.

2) Онтологическая и гносеологическая взаимообусловленность организма и личности означает логическую и эволюционную предопределенность, неразрывность в рамках понятия «человек», как необходимое условие появления и развития друг друга.

Организм человека — биологическая форма существования себя самого, такая, что: 1) обеспечивает постоянство себя, в том числе за счет приспособления к изменяющимся условиям вне и внутри себя; 2) обеспечивает существование идеального — личности; 3) обеспечивает воспроизводство себя.

Личность — идеальная модель себя и окружающего мира, включающая представление о себе (биологической форме — теле, о своем организме, о самой идеальной модели — себе идеальном), об окружающем мире, осуществляющая осознанную самореализацию.

Самореализация — воздействие на себя (идеальное и биологическое) и на окружающий мир (социальное и материальное) с целью достижения удовлетворения.

Предметом изучения медицины является здоровье организма человека. Здоровье личности является предметом психологии. Здоровье организма — такое его состояние, когда все функции осуществляются в полном объеме, и его равновесное состояние внутреннее (гомеостаз) и внешнее, при обычных условиях внешней среды, может продолжаться неопределенно долго [8].

Пояснение:

1) Под обычными условиями внешней среды мы понимаем такие условия, в которых сформировался данный фенотип.

2) Говоря «неопределенно долго», мы вовсе не имеем в виду бесконечно долго, но подразумеваем, что в настоящий момент в организме нет последовательности процессов, приводящих к прекращению его функционирования, и мы не можем предположить, когда он закончит функционировать.

3) Если в организме не реализуются те или иные функции, внешние или внутренние, но при этом установилось равновесие организма, нельзя говорить о полном здоровье, а можно лишь говорить о неполном здоровье.

Цель медицины — поддержание здоровья организма человека. Осуществить ее можно посредством избегания или сокращения степени нездоровья.

Взаимопревращением здоровья является нездоровье, реализуемое в форме болезни или функциональной недостаточности. В данной статье будет рассмотрена лишь такая форма нездоровья, как болезнь.

### 3.2. Болезнь

Болезни как таковой в природе не существует. Это понятие означает класс явлений, объединяющий частные заболевания. Классифицирующим признаком, общим для всех заболеваний, является потеря равновесия процессов функционирования организма.

Конкретная болезнь — совокупность процессов нарушения нормального функционирования организма как результат возмущающих и/или повреждающих факторов (внутренних или внешних) при условии исчерпания уровней адаптивных возможностей организма и реакций организма, направленных на восстановление равновесия [5].

Любая болезнь представляет собой не статическое состояние, но совокупность процессов, которые можно разделить на типы: этиологические, процессы повреждения или возмущения; процессы локализации и противодействия повреждающего фактора; процессы нарушения функционирования систем организма; процессы адаптации к повреждающим факторам; процессы приспособительные.

Данное понимание болезни позволяет переосмыслить ряд устоявшихся взглядов на ее природу.

1) С точки зрения характера болезни, принято делить их на острые и хронические.

Острая болезнь характеризуется следующими этапами: возникновение, развитие болезни и окончание (выздоровление или смерть). Хроническая болезнь, как принято считать, развивается по следующей схеме: возникновение, обострение, ремиссия и дальнейшее протекание по этому циклу. Однако необходимо учитывать, что любая система не может сколь-нибудь долго находиться в неравновесном состоянии без дополнительного притока энергии извне, и поэтому хроническая болезнь как таковая в естественных условиях не может существовать. То, что понимается как хроническая, на самом деле есть острая болезнь с постоянно действующим этиологическим фактором и периодическим приспособлением к действующему этиологическому фактору и срывом адаптации. Вторым вариантом так называемой хронической болезни может быть функциональная недостаточность.

2) При рассмотрении болезни в рамках общей и частной патологии принято принимать во внимание и учитывать лишь патологические процессы, в то время как болезнь образуют и, соответственно, определяют два типа разнонаправленных процессов: процессы, вызывающие нарушения в организме, и процессы, направленные на восстановление равновесия в организме, то есть фактически на прекращение болезни.

Первый тип процессов определяет природу болезни и ее вид, так как формирует само поражение организма. К первому типу следует отнести непосредственно действие этиологического фактора, патологический процесс в органе или функциональной системе, тип этого процесса, его масштаб и локализацию. Эти факторы и должны быть положены в основу классификации болезни, поскольку они в совокупности ее полностью определяют.

Второй тип процессов болезни — ответ на нарушение функционирования систем организма: характеризует картину развития и завершения болезни и определяет индивидуальность ее течения, так как связан с состоянием иных функциональных систем организма, в том числе адаптивных и приспособительных. В случае стандартного (нормального, здорового) состояния организма пациента мы будем наблюдать типичное течение болезни, при наличии каких-либо нарушений в тех или иных системах, задействованных в ответе на патологию, течение болезни изменится и станет «особенным».

Каким же образом может быть определена конкретная болезнь? С одной стороны, в медицинской литературе в большей или меньшей степени раскрыт патогенез большинства заболеваний. С другой стороны, в тех же руководствах врачу предлагается определять вид болезни у конкретного пациента по набору симптомов, описанных в частной терапии. Из глубоких и подробных исследований частной патологии в разделы частной терапии в лучшем случае переключались лишь какие-то новые, дополнительные симптомы заболеваний. Соответственно, теоретическая и практическая медицина воспринимает болезнь, в том числе частную болезнь, как цельное, нераздельное явление, определить которое можно лишь целиком, в совокупности, по признакам-симптомам ей свойственным. Такой эмпирический подход, оправданный и понятный в эпоху отсутствия знаний о процессах, образующих болезнь, становится устаревшим, отсталым в современных условиях. В настоящее время нужна иная методология описания и определения явления «болезнь», основанная на содержательном подходе, подвергнутом анализу.

Естественный способ определения явления есть раскрытие его формы и содержания.

Что же является содержанием и формой болезни?

**Содержанием болезни являются специфические, не свойственные здоровому, нормально функционирующему организму изменения, произошедшие в нем.** Как указано в определении, болезнь есть совокупность, с одной стороны, патологических изменений, суть которых — повреждение тканей либо нарушение процессов, протекающих в организме, что приводит к потере равновесия, с другой — приспособительно-восстановительных реакций, направленных на восстановление равновесия путем восстановления, замещения, компенсации функций; регенерации, замещения, восстановления тканей. Таким образом, сами изменения в тканях либо в процессах функционирования органов и систем организма при болезни в совокупности образуют ее содержание.

Следует различать специфическое и общее содержание болезни. Специфическое содержание болезни есть то, что обуславливает и обуславливается именно этой болезнью, то есть то, что составляет ее сущность. При этом сущностным содержанием будет именно совокупность специфического содержания, полнота его. Неполное содержание говорит о другой сущности и, значит, о другой болезни.

Как указывалось, содержание болезни реализуется в виде повреждения тканей организма и изменения регулирования и протекания физиологических процессов.

Важнейший вопрос: возможно ли изменение протекания физиологических процессов по отношению к нормальному функционированию в условиях отсутствия повреждения тканей организма в ходе болезни? Да, возможно, если ранее в ходе врожденной или приобретенной болезни развилась та или иная функциональная недостаточность.

Любое сущностное изменение в тканях или функционировании систем организма будет объективно проявляться, то есть будут иметь место симптомы, которые можно выявить при опросе, физикальном, лабораторном либо инструментальном исследовании. Задача врача — выявить и дать верную оценку содержательным изменениям в организме.

Другая сторона явления «болезнь» — ее форма. **Форма болезни реализуется в виде процессов (патологических и приспособительно-восстановительных), которые в совокупности ее составляют.** Как и содержание болезни, ее форма — процессы, составляющие болезнь, могут быть специфическими, определяющими сущность болезни, присущими лишь этой болезни, и общими, присущими типу болезни либо болезни вообще. Специфические процессы, в своей совокупности, неизменно присутствуют, составляя

типическую форму этой болезни, а общие процессы обеспечивают вариабельность ее форм при неизменных специфических чертах. Форма заболевания — процессы ее образующие, в отличие от содержания, которое характеризуется наступлением того или иного состояния, проявляется длительностью протекания, локализацией, масштабом, направленностью.

Как уже говорилось, болезнь есть совокупность процессов повреждения или возмущения систем организма и восстановления утраченного равновесия (приспособительно-восстановительных).

Дадим их классификацию:

1) Процессы патологические:

1.1. Повреждение;

1.2. Возмущение — нарушение функции.

2) Процессы приспособительно-восстановительные:

а) адаптивные;

б) противодействие повреждению или возмущению;

в) локализация (отграничение) повреждения или возмущения;

г) временные приспособительные;

е) регенеративные;

ф) постоянные приспособительные.

Вышеуказанные процессы представляют собой формы существования болезней, вне этих процессов-форм болезнь не существует. Каждый из этих типов и подтипов процессов в свою очередь может подразделяться на виды, например, процессы повреждения клетки, органов, функциональной системы и т. д.

Болезнь, как правило, — не один процесс, а целый набор в их последовательности и координации. То есть форма болезни — это процессы в определенной последовательности и взаимосвязи. Таким образом, процессы, образующие болезнь, есть элементы, слагающие ее. А последовательность их, координация и взаимосвязь между ними составляют структуру болезни.

Понятно, что форма и содержание болезни представляют собой единое целое. Содержательные изменения в организме обусловлены соответствующими процессами и не могут происходить вне их. Отсутствие одного из компонентов означает выход организма из явления «болезнь». Так, если мы наблюдаем протекание какого-либо процесса в организме, но он не приводит к патологическому изменению, значит, мы не можем говорить о протекании болезни. С другой стороны, если мы видим наступившие патологические изменения, но никаких патологических процессов не происходит, значит, это уже не болезнь, а наступившая функ-

циональная недостаточность. Форма и содержание только в совокупности образуют болезнь и полностью ее определяют. При наличии только формы или только содержания это есть не болезнь, а иное. Исходя из вышесказанного, определить природу болезни и ее классифицировать можно по набору составляющих ее патологических процессов и этиологическому фактору. Ход болезни определяется ее второй составляющей — приспособительно-восстановительными процессами в организме.

Осложнения болезни — это не продолжение болезни, а реализация их в двух возможных формах — возникновение новой болезни либо функциональная недостаточность органа или системы. Этиологической причиной этих двух форм является болезнь, вызвавшая эти осложнения.

### 3.3. Методы медицины

Медицина оперирует в своей деятельности всего двумя методами — диагностикой и лечением. Рассмотрим методологию диагноза с точки зрения аналитических подходов.

Диагностика — наука и практика определения заболеваний и функциональных недостаточностей, а также рисков развития заболеваний, в том числе состояния адаптивных возможностей организма. В соответствии с этим, диагностика может быть клинической и профилактической. Остановимся в этой статье лишь на клинической диагностике.

В настоящее время общераспространенным, как и ранее, остается метод диагностики по «похожести». Это обусловлено существующими теоретическими знаниями о болезни как цельном нераздельном явлении, которому в совокупности присущ определенный набор симптомов. Понимаемая в настоящее время задача врача — выявить этот набор симптомов и постараться вспомнить, какому заболеванию этот набор соответствует. Для упрощения данной задачи применяется метод «дифференциального диагноза», который должен помочь различить похожее. При этом всем известны издержки диагностики по «похожести»: болезнь в классическом проявлении (с точки зрения набора симптомов) встречается не всегда, часто наблюдаются симптомы, не соответствующие традиционным описаниям, не всегда дифференциальная диагностика позволяет отличить похожие заболевания, трудно проверить истинность диагноза.

Современные знания о болезни и функциональной недостаточности позволяют и требуют аналитической методики установления диагноза. Она предполагает следующий алгоритм.

1) На основе существующих симптомов установление самого факта наличия болезни. Что,

в свою очередь, требует разработки соответствующих разделов семиотики.

2) При установлении факта наличия болезни происходит выявление патологических, этиологических, приспособительно-восстановительных процессов, образующих болезнь, то есть не болезни целиком, но отдельных процессов, ее составляющих. Такой путь предполагает выявление процессов один за одним: вначале, исходя из существующих симптомов, их дополняют выявленными в результате инструментальных и лабораторных исследований, а затем, моделируя причины и следствия выявленных процессов, определяют скрытые процессы, взаимосвязанные с выявленными. В ходе такого диагностирования врач проверяет себя, сравнивая выявленные по симптомам формы и содержания диагностируемых процессов, добиваясь их совпадения. На основе диагностируемых процессов врач синтезирует нозологическую форму болезни. При таком подходе при постановке диагноза мы получим не только наименование нозологической формы болезни, но и ее структуру, конкретный набор присутствующих в данный момент процессов, составляющих болезнь, степень развитости этих процессов.

Вышеприведенная методология вовсе не отвергает, в случаях ярко и типично выраженной клинической картины заболевания, применение метода диагностики по «похожести», однако проверку истинности диагноза нужно вести аналитическим методом.

Реализация аналитического подхода к диагностике требует разработки, в рамках семиотики, теории симптомов болезни вообще, симптомов форм и содержания процессов болезни [8].

Очевидно, что типизация процессов, составляющих болезнь или функциональную недостаточность, и, соответственно, симптомов этой болезни значительно сократит объем фактов, которыми должен оперировать врач, а значит, облегчит ему работу.

#### Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциально-го конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

#### Список литературы / References

1. Healthy life expectancy (HALE) at birth. WHO. <https://www.who.int/data/gho/indicator-metadata-registry/indicator/66>
2. Leape LL, Berwick DM, Bates DW. Counting Deaths Due to Medical Errors — Reply. JAMA. 2002;288(19):2405. DOI: 10.1001/jama.288.19.2405-JLT1120-2-3.
3. Balogh EP, Miller BT, Ball JR. Committee on Diagnostic Error in Health Care; Board on Health Care

Services; Institute of Medicine; Improving Diagnosis in Health Care. Washington (DC): National Academies Press (US); December 29, 2015. DOI: 10.17226/21794.

4. Institute of Medicine (US) Committee on Quality of Health Care in America, Kohn LT, Corrigan JM, Donaldson MS, eds. To Err is Human: Building a Safer Health System. Washington (DC): National Academies Press (US); 2000. DOI: 10.17226/9728.

5. Volkova NI, Volkov AV. To the question of the concept of “disease”. Russ J Preventive medicine. 2022;25(2):81-85. In Russian [Волкова Н.И., Волков А.В. К вопросу о понятии «болезнь». Профилактическая медицина. 2022;25(2):81-85]. DOI: 10.17116/profmed2022502181.

6. Big medical encyclopedia. 3rd ed. Vol. 7. Ed. B. V. Petrovsky. Moscow: Soviet Encyclopedia Publishing House; 1977:241-256. In Russian [Большая медицинская энциклопедия. 3-е изд. Том 7. / Под ред. Б. В. Петровского. М.: Изд-во «Советская энциклопедия». 1977:241-256].

7. Big medical encyclopedia. 3rd ed. Vol. 8. Ed. B. V. Petrovsky. Moscow: Soviet Encyclopedia Publishing House; 1978:1047-1051. In Russian [Большая медицинская энциклопедия. 3-е изд. Том 8. / Под ред. Б. В. Петровского. М.: Изд-во «Советская энциклопедия». 1978:1047-1051].

8. Volkova NI, Volkov AV. On some issues of medical semiotics. Russ J Medical Bulletin of the South of Russia. 2023;14(1):31-37. In Russian [Волкова Н.И., Волков А.В. К некоторым вопросам медицинской семиотики. Медицинский вестник Юга России. 2023;14(1):31-37]. <https://doi.org/10.21886/2219-8075-2023-14-1-31-37>

9. Volkova NI, Volkov AV. Form and content of “disease”. Russ J South Russian Journal of Therapeutic Practice. 2022;3(2):116-121. In Russian [Волкова Н.И., Волков А.В. Форма и содержание «Болезни». Южно-Российский журнал терапевтической практики. 2022;3(2):116-121]. <https://doi.org/10.21886/2712-8156-2022-3-2-116-121>

10. Minasyan AM. Dialectics as logic. Rostov-on-Don: RISI, 1991. 536 p. In Russian [Минасян А.М. Диалектика как логика. Ростов-на-Дону: РИСИ, 1991. 536 с.].

#### Информация об авторах:

Волкова Наталья Ивановна, д.м.н., профессор, заведующая кафедрой внутренних болезней № 3, ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России;

Волков Андрей Владимирович, исполнительный директор центра «Госпиталь современной медицины».

#### Authors information:

Natalya I. Volkova, M.D., Ph.D., Professor, Head of the Department of Internal Medicine No. 3, Rostov State Medical University;

Andrey V. Volkov, Executive Director of the center “Hospital of Modern Medicine”.