



ВЕСТНИК

**Башкирского государственного
медицинского университета**

сетевое издание

ISSN 2309-7183



№ 5, 2021
vestnikbgmu.ru

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ВЕСТНИК

Башкирского государственного медицинского университета

сетевое издание № 5, 2021 г.

Редакционная коллегия:

Главный редактор: член-корр. РАН, проф. Павлов В.Н. – ректор Башкирского государственного медицинского университета (Уфа).

Зам. главного редактора: проф. Нартайлаков М.А. (Уфа)

Члены редакционной коллегии:

проф. Ахмадеева Л.Р. (Уфа); проф. Валишин Д.А. (Уфа); проф. Верзакова И.В. (Уфа); проф. Викторова Т.В. (Уфа); проф. Галимов О.В. (Уфа); проф. Гильманов А.Ж. (Уфа); проф. Гильмутдинова Л.Т. (Уфа); проф. Еникеев Д.А. (Уфа); проф. Загидуллин Н.Ш. (Уфа); проф. Катаев В.А. (Уфа); к.м.н. Кашаев М.Ш. (Уфа); проф. Мавзютов А.Р. (Уфа); проф. Малиевский В.А. (Уфа); проф. Минасов Б.Ш. (Уфа); проф. Моругова Т.В. (Уфа); проф. Новикова Л.Б. (Уфа); проф. Рахматуллина И.Р. (Уфа); проф. Сахаутдинова И.В. (Уфа); доц. Цыглин А.А. (Уфа)

Редакционный совет:

член-корр. РАН, проф. Аляев Ю.Г. (Москва); проф. Бакиров А.А. (Уфа); проф. Вольф Виланд (Германия); проф. Вишневский В.А. (Москва); проф. Виктор В.В. (Уфа); проф. Гальперин Э.И. (Москва); проф. Ганцев Ш.Х. (Уфа); академик РАН, проф. Долгушин И.И. (Челябинск); академик РАН, проф. Котельников Г.П. (Самара); академик РАН, проф. Кубышкин В.А. (Москва); проф. Мулдашев Э.Р. (Уфа); проф. Прокопенко И. (Великобритания); проф. Созинов А.С. (Казань); член-корр. РАН, проф. Тимербулатов В.М. (Уфа); доц. Хартманн Б. (Австрия); академик РАН, проф. Чучалин А.Г. (Москва); доц. Шебаев Г.А. (Уфа); проф. Шигуан Ч. (Китай); проф. Ян Б. (Китай)

Состав редакции сетевого издания «Вестник Башкирского государственного медицинского университета»:

зав. редакцией – к.м.н. Насибуллин И.М.

научный редактор – к.филос.н. Афанасьева О.Г.

корректор-переводчик – к.филол.н. Майорова О.А.

FEDERAL STATE BUDGETARY EDUCATIONAL INSTITUTION OF HIGHER EDUCATION
BASHKIR STATE MEDICAL UNIVERSITY
THE MINISTRY OF HEALTHCARE OF THE RUSSIAN FEDERATION

VESTNIK BASHKIR STATE MEDICAL UNIVERSITY

online news outlet No. 5, 2021

Editorial board:

Editor-in-chief: corresponding member of the Russian Academy of Sciences, Professor Pavlov V.N.
– Rector of Bashkir State Medical University (Ufa)

Deputy editor-in-chief: Professor Nartailakov M.A. (Ufa)

Members of editorial board:

professor Akhmadeeva L.R. (Ufa); professor Valishin D.A. (Ufa); professor Verzakova I.V. (Ufa);
professor Viktorova T.V. (Ufa); professor Galimov O.V. (Ufa); professor Gilmanov A.Zh. (Ufa);
professor Gilmutdinova L.T.(Ufa); professor Yenikeev D.A. (Ufa); professor Zagidullin N.Sh.
(Ufa); professor Kataev V.A. (Ufa); associate professor Kashaev M.Sh. (Ufa); professor Mavzyutov
A.R. (Ufa); professor Malievsky V.A. (Ufa); professor Minasov B.Sh. (Ufa); professor Morugova
T.V. (Ufa); professor Novikova L.B. (Ufa); professor Rakhmatullina I.R. (Ufa); professor
Sakhautdinova I.V. (Ufa); associate professor Tsyglin A.A. (Ufa)

Editorial review board:

corresponding member of the Russian Academy of Sciences professor Alyaev Yu.G. (Moscow);
professor Bakirov A.A. (Ufa); professor Wolf Wieland (Germany); professor Vishnevsky V.A.
(Moscow); professor Viktorov V.V. (Ufa); professor Galperin E.I. (Moscow); professor Gantsev
Sh.Kh. (Ufa); academician of the Russian Academy of Sciences, professor Dolgushin I.I.
(Chelyabinsk); academician of the Russian Academy of Sciences, professor Kotelnikov G.P.
(Samara); Academician of the Russian Academy of Sciences, Professor Kubyshkin V.A. (Moscow);
professor Muldashev E.R. (Ufa); professor Prokopenko I. (Great Britain); professor Sozinov A.S.
(Kazan); corresponding member of the Russian Academy of Sciences, professor Timerbulatov
V.M. (Ufa); associate Professor Hartmann B. (Austria); academician of the Russian Academy of
Sciences, professor Chuchalin A.G. (Moscow); associate professor Shebaev G.A. (Ufa); professor
Shiguang Zh. (China); professor Yang B. (China)

Editorial staff of the online publication "Vestnik of Bashkir State Medical University":

Managing editor: Nasibullin I. M., MD, PhD

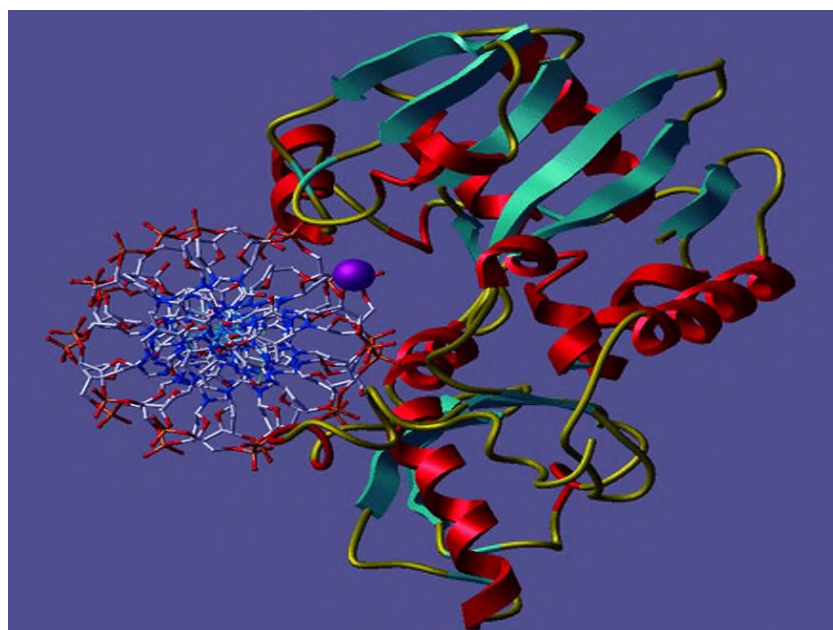
Science editor: Afanasyeva O. G., PhD

Translator-proofreader: Mayorova O. A., PhD

Издание посвящено Всероссийской научно-практической
конференции «Биохимия - основа жизни»
17 сентября, 2021
г. Уфа

под редакцией
д.м.н., проф. Галимова Ш.Н.

Редакционная коллегия:
д.м.н., проф. Камиллов Ф.Х., д.м.н., доцент Галимова Э.Ф.



СОДЕРЖАНИЕ

<p>Абдуллина Г.М., Камиллов Ф.Х., Карягина Н.Т., Кулагина И.Г. ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ В ТКАНИ ПЕЧЕНИ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ГИПОТИРЕОЗА, ОБУСЛОВЛЕННОГО ДЕФИЦИТОМ ЙОДА (НИЗКОЙОДНАЯ ДИЕТА)</p>	7	<p>Abdullina G.M., Khamilov F.Kh, Karyagina N.T., Kulagina I.G. OXIDATIVE METABOLISM IN LIVER IN MODELING OF HYPOTHYROIDISM CAUSED BY IODINE DEFICIENCY (LOW IODINE DIET)</p>
<p>Алмакаева Л.Ф., Байбурина Д.Э., Камиллов Ф.Х., Гребнев Д.Ю. ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ БАЛАНС И КОГНИТИВНЫЕ ФУНКЦИИ ПОТОМСТВА КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ГИПОТИРЕОЗОМ</p>	13	<p>Almakaeva L.F., Bayburina D.E., Kamilov F.Kh., Grebnev D.Yu. OXIDATIVE BALANCE AND COGNITIVE FUNCTIONS OF THE OFFSPRING OF RATS WITH EXPERIMENTAL HYPOTHYROIDISM</p>
<p>Валиуллина Л.А., Бикметов К.А., Бикметова Э.Р., Меньшикова И.А. БИОХИМИЧЕСКАЯ РОЛЬ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ В РАЗВИТИИ ДЕТЕЙ</p>	20	<p>Valiullina L. A., Bikmetov K. A., Bikmetova E. R., Menshikova I. A. THE BIOCHEMICAL ROLE OF TRACE ELEMENTS IN THE DEVELOPMENT OF CHILDREN</p>
<p>Галимова С.Ш. ЗАГРЯЗНЕНИЕ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ И МУЖСКОЕ БЕСПЛОДИЕ: ВВЕДЕНИЕ В ПРОБЛЕМУ</p>	27	<p>Galimova S.Sh. ENVIRONMENTAL POLLUTION AND MALE INFERTILITY: AN INTRODUCTION TO THE PROBLEM</p>
<p>Гайковая Л.Б., Стюф И. Ю., Улейская Г.И., Сясина Т.В., Евтеева Д.А., Власова Ю.А., Малахова М.Я. ЛИПИДЫ КРОВИ И КЛЕТОЧНЫЙ ИММУНИТЕТ У ПАЦИЕНТОВ С COVID-19 В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ ЗАБОЛЕВАНИЯ</p>	32	<p>Gaikovaya L.B., Stiouf I.Y., Uleiskay G.I., Syasina T.V., Evteeva D.A., Vlasova Y. A., Malakhova M.Y. BLOOD LIPIDS AND CELLULAR IMMUNITY IN PATIENTS WITH COVID-19, DEPENDING ON THE SEVERITY OF THE DISEASE</p>
<p>Громенко Ю.Ю., Громенко И.Д., Галимова Э.Ф., Галимов Ш.Н. «О РОЛИ микроРНК В РАЗВИТИИ МУЖСКОГО БЕСПЛОДИЯ»</p>	39	<p>Y.Y. Gromenko, I.D. Gromenko, Galimova E.F., S.N. Galimov "ROLE OF MicroRNAs IN THE DEVELOPMENT OF MALE INFERTILITY "</p>
<p>Карягина Н.Т., Кулагина И.Г., Абдуллина Г.М., Камиллов Ф.Х. ИНТЕГРАЦИЯ НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ В ОБЛАСТИ ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ БИОХИМИИ В ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫЙ ПРОЦЕСС ПО СПЕЦИАЛЬНОСТЯМ 31.05.01 ЛЕЧЕБНОЕ ДЕЛО И 32.05.01 МЕДИКО- ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЕ ДЕЛО</p>	46	<p>Karyagina N.T., Kulagina I.G., Abdullina G.M., Kamilov F.Kh. INTEGRATION OF SCIENTIFIC RESEARCH IN THE FIELD OF ENVIRONMENTAL BIOCHEMISTRY INTO THE EDUCATIONAL PROCESS IN THE SPECIALTIES 31.05.01 GENERAL MEDICINE AND 32.05.01 MEDICAL AND PREVENTIVE CARE</p>
<p>Курамшина Г.Р., Меньшикова И.А., Фаршатова Е.Р., Камиллов Ф.Х. АНТИОКИСЛИТЕЛЬНАЯ СИСТЕМА ПЕЧЕНИ ПРИ ДЕЙСТВИИ СОЛЕЙ</p>		<p>Kuramshina G.R., Menshikova I.A., Farshatova E.R., Kamilov F.X. ANTIOXIDANT LIVER SYSTEM AT THE ACTION OF HEAVY METAL</p>

ТЯЖЁЛЫХ МЕТАЛЛОВ МЕДНО-ЦИНКОВОЙ КОЛЧЕДАННОЙ РУДЫ И ВВЕДЕНИИ АНТИОКСИДАНТНОГО ВИТАМИННОГО ПРЕПАРАТА	53	SALTS OF COPPER-ZINC SQUARE ORE AND ADMINISTRATION OF ANTIOXIDANT VITAMIN PREPARATION
Кузьмина О.И., Саптарова Л.М., Галимов Ш.Н. ПРОТЕОМИКА: ТЕХНОЛОГИИ И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ	58	Kuzmina O.I., Saptarova L.M., Galimov Sh.N. PROTEOMICS: TECHNOLOGIES AND THEIR APPLICATIONS
Марсянова Ю.А., Звягина В.И. ИЗМЕНЕНИЕ НЕКОТОРЫХ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ МИТОХОНДРИЙ ПРИ АДАПТАЦИИ К ГИПОКСИИ	64	Marsyanova Y.A., Zvyagina V.I. CHANGE OF SOME BIOCHEMICAL INDICATORS OF MITOCHONDRIA DURING ADAPTATION TO HYPOXIA
Меньшикова И.А., Бикметова Э.Р., Камиллов Ф.Х., Галимов Ш.Н. ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИНГИБИТОРА СКЛЕРОСТИНА ДЛЯ КОРРЕКЦИИ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ В КОСТНОЙ ТКАНИ У ПАЦИЕНТОВ С ОСТЕОПОРОЗОМ	69	Menshikova I.A., Bikmetova E.R., Kamilov F.X., Galimov Sh.N. THE POSSIBILITY OF USING A SCLEROSTIN INHIBITOR FOR THE CORRECTION OF METABOLIC DISORDERS IN BONE TISSUE IN PATIENTS WITH OSTEOPOROSIS
Середа Е.Е., Колегова Е.С., Какурина Г.В., Сиденко Е.А., Тарабановская Н.А., Дорошенко А.В., Кондакова И.В. СОПОСТАВЛЕНИЕ ПЯТИЛЕТНИХ РЕЗУЛЬТАТОВ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЬНЫХ ЛЮМИНАЛЬНЫМ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С АКТИВНОСТЬЮ ПРОТЕАСОМ	75	Sereda E.E., Kolegova E.S., Kokurina G.V., Sidenko E.A., Tarabanovskaya N.A., Doroshenko A.V., Kondakova I.V. COMPARISON OF FIVE-YEAR RESULTS OF TREATMENT OF PATIENTS WITH LUMINAL BREAST CANCER WITH PROTEASOME ACTIVITY
Спирина Л.В., Августинович А.В., Афанасьев С.Г. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ	83	Spirina L.V., Avgustinovich A.V., Afanasev S.G. MOLECULAR MECHANISMS OF RESISTANCE DEVELOPMENT TO ANTITUMOR THERAPY
Baigildina A. A. BIOCHEMICAL MECHANISMS OF ADAPTATION OF THE VASCULAR ENDOTHELUM AT PUUMALA-ASSOCIATED HEMORRHAGIC FEVER WITH RENAL SYNDROME	90	
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ		
Саптарова Л.М., Кузьмина О.И. ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ В СОВРЕМЕННОЙ МЕДИЦИНЕ	100	Saptarova L.M., Kuzmina O.I. GENE ENGINEERING IN MODERN MEDICINE
ТРЕБОВАНИЯ К РУКОПИСЯМ, НАПРАВЛЯЕМЫМ В ЖУРНАЛ «ВЕСТИК БАШКИРСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО МЕДИЦИНСКОГО УНИВЕРСИТЕТА»	107	

Абдуллина Г.М., Камиллов Ф.Х., Карягина Н.Т., Кулагина И.Г.
**ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ В ТКАНИ ПЕЧЕНИ ПРИ
МОДЕЛИРОВАНИИ ГИПОТИРЕОЗА, ОБУСЛОВЛЕННОГО ДЕФИЦИТОМ ЙОДА
(НИЗКОЙОДНАЯ ДИЕТА)**

Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа

Йододефицитные заболевания щитовидной железы занимают лидирующее место в структуре тиреоидной патологии, тем не менее в экспериментальных исследованиях преобладают хирургические и химические методы индуцирования гипотиреоза. В статье приведены результаты изучения окислительного метаболизма в ткани печени экспериментальных животных, содержащихся на низкоiodной диете. Полученные результаты сопоставлены с данными об изменениях окислительного метаболизма при использовании других экспериментальных моделей гипотиреоза.

Ключевые слова. Низкоiodная диета, окислительный метаболизм, цитохромоксидаза, малоновый диальдегид.

Abdullina G.M., Khamilov F.Kh, Karyagina N.T., Kulagina I.G.
**OXIDATIVE METABOLISM IN LIVER IN MODELING OF HYPOTHYROIDISM
CAUSED BY IODINE DEFICIENCY (LOW IODINE DIET)**

Bashkir State Medical University, Ufa

Iodine deficiency diseases are leading in the structure of thyroid pathology. The article presents the results of a study of oxidative metabolism in liver of experimental animals, kept on a low iodine diet. The data obtained are compared with data on changes in oxidative metabolism when using other experimental models of hypothyroidism.

Key words: Low-iodine diet, oxidative metabolism, cytochrome oxidase, malondialdehyde.

Актуальность. По современным оценкам около 2 миллиардов человек проживает в условиях хронической йодной недостаточности различной степени выраженности. Именно йододефицитные заболевания являются одной из самых распространенных форм как тиреоидной, так и эндокринной патологии в целом [11]. В то же время в экспериментальной тиреодологии для воспроизведения тиреоидной дисфункции чаще используются методы, основанные на введении тиреостатиков, либо хирургические методы, тогда как модели, основанные на воспроизведении гипотиреоза путем содержания животных на низкоiodной диете, не получили достаточного распространения.

Цель исследования.

Изучить изменения окислительного метаболизма в ткани печени крыс, содержащихся на низкоiodной диете.

Материалы и методы.

Эксперимент проведен на беспородных белых половозрелых крысах-самцах массой 150-200 г. Животные были разделены на 3 группы. Первая группа находилась на стандартной диете вивария (контроль). Вторая группа - на специальной диете с низким содержанием йода менее 0,02 мкг/г (НЙД) [10], третья группа содержалась на низкоiodной диете с дополнительным введением калия йодида из расчета суточной потребности крыс в йоде (НЙД+KI). Животные находились на описанных схемах питания в течение 3-х месяцев.

По истечении трех месяцев с целью оценки тиреоидзависимого метаболизма животных, содержащихся на низкоiodной диете, в гомогенате печени экспериментальных

животных определялась активность цитохромоксидазы, содержание вторичных ТБК-реактивных продуктов перекисного окисления липидов (малоновый диальдегид, МДА).

Активность цитохромоксидазы в митохондриальной фракции гомогената печени определялась по скорости окисления диметил-п-фенилдиамина (ДЛФД) в присутствии цитохрома с [1]. Для определения ТБК-активных продуктов в сыворотке крови использовали набор реактивов «ТБК-АГАТ». Принцип действия основан на взаимодействии продуктов ПОЛ (в основном МДА) с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) с образованием окрашенного комплекса, экстрагируемого бутанолом.

Математическую обработку результатов производили методами непараметрической статистики с помощью программного пакета STATISTICA-12 путем расчета медианы (Me), верхнего и нижнего квартилей [Q₁-Q₂], достоверность различий между группами оценивали с помощью U критерия Манна-Уитни. Различия считали достоверными при P≤0,05.

Результаты и их обсуждение

Широко известен эффект тиреоидных гормонов на митохондриальное дыхание, опосредованный влиянием на экспрессию генов и активность различных компонентов митохондриальной цепи, в частности, важнейших ее компонентов - АТФ-синтазы и цитохром с оксидазы (цитохромоксидазы) [7]. Показано, что Т₃ оказывает координированный стимулирующий эффект на экспрессию как митохондриальных, так и ядерных генов полипептидных цепей цитохромоксидазы, ведущий к увеличению функциональной активности холофермента, причем эффект этот тканеспецифичен и наиболее выражен, например, в ткани печени, но не в миокарде [12].

Выраженное снижение активности цитохромоксидазы, выявленное в ткани печени животных, содержащихся на низкоiodной диете, и составившее лишь 68,5% от активности в контрольной группе, (табл. 1, рис.), можно считать результатом снижения интенсивности тиреоидной сигнализации, тем более, что у животных, получавших дополнительно к низкоiodной диете калия йодид, активность фермента почти не отличалась от активности в группе контрольных животных.

Таблица 1

Активность цитохромоксидазы в митохондриальной фракции гомогената печени крыс, содержащихся на низкоiodной диете (нмоль/ мин на мг белка, Me, [Q₁ -Q₂], n=12)

Группа животных	Активность фермента
1-я группа (контроль)	165,5[161,0; 230,0]
2-я группа (НЙД)	113,5 [104,0;161,0] P=0,0202
3-я группа (НЙД +KI)	163,5[112,0;229,0] P=0,4714; P*=0,0456

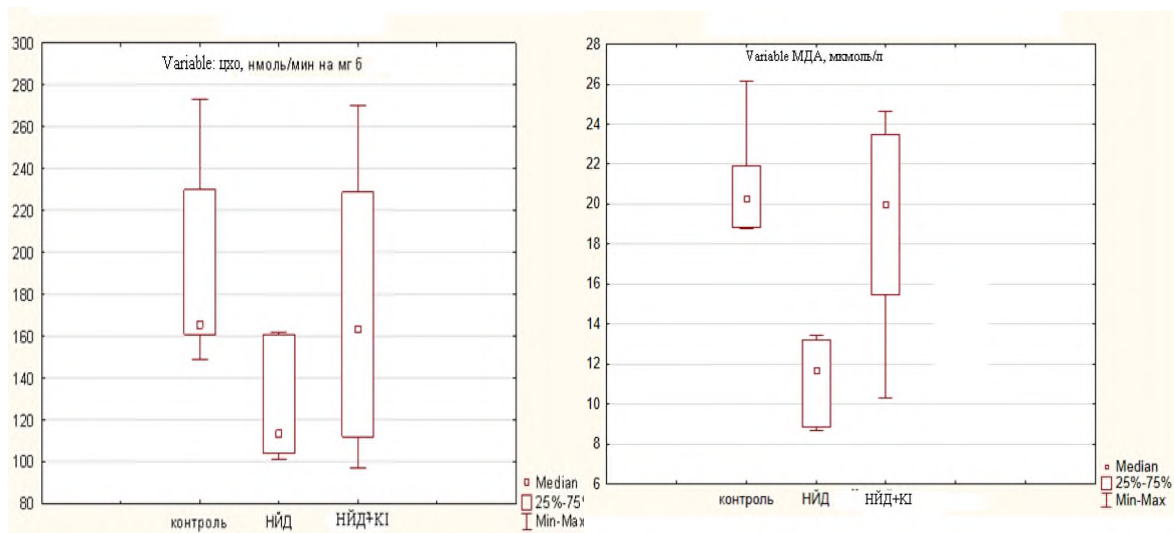


Рис. Активность цитохромоксидазы в митохондриальной фракции (нмоль/мин на мг белка) и содержание МДА в гомогенате печени крыс (мкмоль/л), содержащихся на низкокалорийной диете. Me, [Q25%-75%], n=12).

Митохондриальная дыхательная цепь является главным источником активных форм кислорода, инициирующих свободно-радикальное окисление. Цитохромоксидаза как терминальное звено дыхательной цепи, осуществляющее перенос электронов с цитохрома с на кислород, непосредственно определяет интенсивность клеточного аэробного метаболизма. В связи с этим вполне закономерным можно считать обнаруженное параллельно со снижением активности одного из наиболее мощных ферментов аэробного метаболизма снижение концентрации индикатора интенсивности процессов свободно-радикального окисления - малонового диальдегида (МДА). У животных, находившихся на низкокалорийной диете в течение 3-х месяцев, концентрация МДА в гомогенатах печени составляла лишь 58 % от уровня контрольных животных (табл. 2, рис.2). В то же время многочисленные источники сообщают об обратном – увеличении концентрации МДА, а также других продуктов свободно-радикальных процессов (карбонилированные белки) у пациентов с различными формами гипотиреоза (первичный, субклинический), а также в тканях животных с экспериментальным гипотиреозом [5,6,8,13].

Таблица 2

Содержание МДА в гомогенатах печени крыс, содержащихся на низкокалорийной диете (Me, [Q₁-Q₃], n=12)

Продукты ПОЛ	1 группа (контроль)	2 группа (НИД)	3 группа (НИД+ KI)
Содержание МДА, мкмоль/л	20,2895 [18,8096;21,9392]	11, 6766 [8.7770; 13,2222] P=0,0127	20,1313 [15,4555;23,4666] P=1,0000; P*=0,0182

Развитие окислительного стресса при гипертиреозе легко объяснимо. Активация окислительных процессов и потребления кислорода тканями (и соответственно продукция активных форм кислорода) - одно из специфичных проявлений действия тиреоидных гормонов на клеточный метаболизм. Окислительный стресс при гипотиреозе ряд авторов объясняет снижением антиоксидантной защиты, а также формированием в тканях определенного прооксидантного липидного окружения. Снижение скорости обмена липидов (замедление липолиза), изменение липидного состава и доступности субстратов ПОЛ могут увеличивать восприимчивость к окислительному стрессу и обеспечивать усиление процессов перекисного окисления [2,14].

Несомненно, степень тяжести тиреоидной дисфункции, тонкие механизмы обратной связи и многие другие факторы определяют подчас противоречивые результаты, полученные при изучении напряженности свободно-радикальных процессов при гипотиреозе. В то же время не вызывает сомнения, что противоречивость данных, полученных при изучении оксидантного статуса при отклонениях тиреоидной сигнализации, в той или иной степени обусловлена и используемыми исследователями различными экспериментальными моделями.

Сравнительном анализ изменений интенсивности свободно-радикальных процессов при моделировании гипотиреоза путем тиреоидэктомии и метимазол-индуцированном гипотиреозе выявил следующее. Гипотиреоз, вызванный тиреоидэктомией, сопровождался снижением продукции АФК в миокарде и печени, в то время как гипотиреоз, вызванный приемом пропитуриурацила и метимазола, сопровождался развитием окислительного стресса в тех же тканях - наблюдалось увеличение продуктов липопероксидации, снижение активности каталазы (гемопроtein, как и тиреоидпероксидаза), без изменений активности изоферментов СОД - супероксиддисмутазы [4]. Сообщается, что патохимические изменения в ткани печени при метимазолиндуцированном гипотиреозе развиваются ввиду повреждения клеток печени токсичными продуктами СYP450 зависимой биотрансформации препарата – 4,5-эпоксдом, а также продуктами его последующего гидролиза – глиоксаля и N-метилтиомочевинных [3,9]. Таким образом, при химической индукции гипотиреоза патохимические сдвиги отчасти могут быть вызваны и внетиреоидными эффектами вводимых ксенобиотиков.

Заключение

Среди широкого спектра методов, используемых для моделирования гипотиреоза, низкобелковая диета является одним из наиболее предпочтительных методов и позволяет более

объективно оценить изменения, возникающих в организме при дефиците йода и тиреоидных гормонов.

Литература

1. Асатиани В.С. Ферментные методы анализа. – Москва. – «Наука» - 1969. – с.610-611.
2. Байбурина Г.А. Роль путей клеточной сигнализации в развитии последствий окислительного стресса // Медицинский вестник Башкортостана – 2016.- Т.11. №2 (62)- с.82-91.
3. Cano-Europa, E. Methimazole-induced hypothyroidism causes alteration of the REDOX environment, oxidative stress, and hepatic damage; events not caused by hypothyroidism itself/ E. Cano-Europa [at all]//Annals of Hepatology. -2010. -vol.9. no.1. – P.80–88.
4. Cano-Europa, E. Methimazole-induced hypothyroidism causes cellular damage in the spleen, heart, liver, lung and kidney/ E. Cano-Europa // Acta Histochemica. 2011. -vol.113. -no.1. -P1–5.
5. Coria, M. Serum oxidative stress parameters of women with hypothyroidism/ M. J. Coria, A. I. Pastr'an, M. S. Gimenez// Acta BiomedicaAteneiParmensis. -2009. -vol.80. P.135–139.
6. Haribabu, A. Evaluation of protein oxidation and its association with lipid peroxidation and thyrotropin levels in overt and subclinical hypothyroidism/ A. Haribabu [at all]//Endocrine. -2013. -vol.44. -no.1. -P.152–157.
7. Harper, M. Effects of thyroid hormones on oxidative phosphorylation/ M.E. Harper // Biochem Soc Trans.-1993.- 21(Pt 3). -P.785–792.
8. Kebapcilar, L. Plasma thiobarbituric acid-reactive substance levels in subclinical hypothyroidism/ L. Kebapcilar [at all]//Medical Principles and Practice. -2007. -vol.16. -no.6. -P.432– 436.
9. Ortiz-Butron, R. An increase of oxidative stress markers and the alteration of the antioxidant enzymatic system are associated with spleen damage caused by methimazole induced hypothyroidism/ R.Ortiz-Butron [at all]// Drug and Chemical Toxicology. -2011.- vol. 34. -no.2.- P.180–188.
10. Pedraza, P. Mechanism of adaptation to Iodin deficiency in Rats: Thyroid status is tissue specific/ P.E Pedraza [at all]// Endocrinology. – 2006. - 147(5). – P.2098-2108.
11. The Lancet. Iodine deficiency - way to go yet// The Lancet. -2008. - Volume 372 - Issue 9633. - P.88
12. Treace, E. Tissue-specific regulation of cytochrome c oxidase subunit expression by thyroid hormone/ E. Treace [at all]//Am J Physiol Endocrinol Metab. -2004. - 286: - P.968–974.
13. Torun, A. Serum total antioxidant status and lipid peroxidation marker malon dialdehyde levels in overt and subclinicalhypothyroidism/ A.N.Torun [at all]//ClinicalEndocrinology. -2009. -vol.70. -no. 3. -P.469–474.

14. Venditti, P. Effect of thyroid state on lipid peroxidation, antioxidant defense, and susceptibility to oxidative stress in rat tissues/ P. Venditti [at all]// Journal of Endocrinology.-1997.- vol.155. - no.1.-P.151–157.

Сведения об авторах статьи:

Абдуллина Гузель Маратовна – кандидат биологических наук, доцент кафедры биологической химии ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа, ул. Ленина 3. e-mail gmabdullina@mail.ru.

Камилов Феликс Хусанович – доктор медицинских наук, профессор кафедры биологической химии ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа, ул. Ленина 3. e-mail bro-raops@yandex.ru

Карягина Наиля Тимерхатмулловна – кандидат медицинских наук, доцент кафедры биологической химии ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа, ул. Ленина 3. e-mail karneltim@yandex.ru

Кулагина Ирина Геннадиевна - кандидат биологических наук, доцент кафедры биологической химии ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа, ул. Ленина 3. e-mail coolagin@list.ru

Алмакаева Л.Ф.¹, Байбурина Д.Э.¹, Камиллов Ф.Х.¹, Гребнев Д.Ю.²

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ БАЛАНС И КОГНИТИВНЫЕ ФУНКЦИИ ПОТОМСТВА КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ГИПОТИРЕОЗОМ

¹ *Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа*
² *Уральский государственный медицинский университет, г. Екатеринбург*

Цель – исследование состояния про/антиоксидантной системы головного мозга и оперативной пространственной памяти у потомства животных с экспериментальным гипотиреозом.

Методы. Экспериментальный гипотиреоз у крыс опытной группы вызывали путем ежедневного внутрижелудочного введения в течение 3 недель тиамазола (мерказолила) по 25 мг/кг массы тела, контрольная группа животных ежедневно получала физиологический раствор. На 22-е сутки животных обеих групп (каждую в отдельности) спаривали, помещая в клетки по две самки и одному самцу. У потомства животных – двухмесячных крысят-самцов – определяли содержание тиреотропного гормона, общего и свободного тироксина методом иммуноферментного анализа. В ткани мозга определяли уровень первичных и вторичных продуктов липопероксидации, активность супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы и каталазы. Для оценки когнитивных функций мозга использовали тест «Распознавание новых объектов».

Результаты. Результаты теста «Распознавание новых объектов» свидетельствуют о снижении когнитивной функции с нарушениями кратковременной и долговременной памяти потомства крыс с мерказолиловым гипотиреозом, сопряженное со статистически значимым увеличением в ткани головного мозга первичных и вторичных продуктов ПОЛ и снижением активности антиоксидантных ферментов – СОД, ГПО и каталазы.

Заключение. Результаты исследования свидетельствуют о негативном влиянии йодного дефицита родителей на тиреоидный статус потомства, вызывая окислительного стресса и, вероятно, морфологические изменения структур центральной нервной системы потомства на этапах дифференцировки и созревания мозга, которые в дальнейшем трансформируются в нарушение интеллектуального развития.

Ключевые слова: экспериментальный гипотиреоз, окислительный стресс, когнитивные расстройства.

Almakaeva L.F.¹, Bayburina D.E.¹, Kamilov F.Kh.¹, Grebnev D.Yu.²

OXIDATIVE BALANCE AND COGNITIVE FUNCTIONS OF THE OFFSPRING OF RATS WITH EXPERIMENTAL HYPOTHYROIDISM

¹ *Bashkir State Medical University, Ufa*
² *Ural State Medical University, Ekaterinburg*

The aim is to study the state of the pro / antioxidant system of the brain and operational spatial memory in the offspring of animals with experimental hypothyroidism.

Methods. Experimental hypothyroidism in rats of the experimental group was induced by daily intragastric administration for 3 weeks of thiamazole (mercazolil) at 25 mg / kg body weight, the control group of animals received daily saline. On the 22nd day, animals of both groups (each separately) were mated, placing two females and one male in cages. In the offspring of animals - two-month-old male rats - the content of thyroid-stimulating hormone, total and free thyroxine was determined by the method of enzyme-linked immunosorbent assay. In the brain tissue, the level of primary and secondary lipid peroxidation products, the activity of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase were determined. To assess the cognitive functions of the brain, the test "Recognition of new objects" was used.

Results. The results of the New Object Recognition test indicate a decrease in cognitive function with impaired short-term and long-term memory in the offspring of rats with mercazolil hypothyroidism, associated with a statistically significant increase in the brain tissue of primary and secondary lipid peroxidation products and a decrease in the activity of antioxidant enzymes - SOD, GPO and catalase.

Conclusion. The results of the study indicate a negative effect of iodine deficiency of parents on the thyroid status of the offspring, causing oxidative stress and, probably, morphological changes in the structures of the central nervous system of the offspring at the stages of brain differentiation and maturation, which are subsequently transformed into impaired intellectual development.

Key words: experimental hypothyroidism, oxidative stress, cognitive impairment.

Актуальность. Основными причинами развития первичного гипотиреоза являются врождённые или наследственные дефекты ферментов и других белков, участвующих в гормоногенезе, транспорте и рецепции гормонов тиреоидной системы, генетическая предрасположенность к аутоиммунным заболеваниям, дефицит поступления йода в организм в эндемичных территориях по содержанию йода в почве и воде, а также деструкция ткани

щитовидной железы после хирургических вмешательств и лечения тиреотоксикоза радиоактивным йодом. Недостаточное потребление йода создает серьезные проблемы для здоровья десятков миллионов россиян, угрожает умственному и физическому развитию детей. Ежегодно в России рождается более 200 тыс. детей с нарушениями функции мозга, обусловленными йододефицитом [1]. Особенно уязвимы к йододефициту беременные женщины, кормящие матери и дети. Если клинические проявления гипотиреоза у плода при недостаточности поступления йода в организм матери или при кормлении грудью в периоде постнатального развития ребёнка достаточно изучены, то патогенетические механизмы и метаболические основы когнитивных и других нарушений функции мозга во многом остаются неясными [2,6,12].

Цель работы – исследование состояния про/антиоксидантной системы головного мозга и оперативной пространственной памяти у потомства животных с экспериментальным гипотиреозом.

Материалы и методы

Исследования проведены на 20 двухмесячных крысятах-самцах, которые родились у животных контрольной и опытной групп. Эксперименты выполнены с соблюдением этических норм и рекомендаций по гуманному обращению с лабораторными животными. Крысы находились в виварии на полноценном рационе питания (комбикорм для лабораторных животных ЗАО «Ассортимент-Агро», Россия) со свободным доступом к воде. У родителей (самки и самцы) крысят опытной группы вызывали развитие гипотиреоза путем ежедневного внутрижелудочного введения в течение 3 недель тиамазола (мерказолила) по 25 мг/кг массы тела [4], контрольная группа животных ежедневно получала физиологический раствор. На 22-е сутки животных обеих групп (каждую в отдельности) спаривали, помещая в клетки по две самки и одному самцу. В результате скрещивания крыс беременность и лактация самок опытных групп проходила в условиях мерказолилового гипотиреоза. Мерказолил ингибирует активность ферментных систем, участвующих в окислении йодидов, в йодировании радикалов тирозина в составе тиреоглобулинов, ускоряет выведение йодидов из щитовидной железы, моделируя йододефицитный гипотиреоз [10].

В плазме крови у крысят определяли содержание тиреотропного гормона (ТТГ, реагенты ТТН-EIA-5296, производитель DRG Diagnostics HmbH), общего (oT₄) и свободного (сT₄) тироксина (реагенты ЗАО «Вектор-Бест», Россия) методом иммуноферментного анализа (анализатор «StatFox2100», США). В ткани мозга определяли уровень первичных и вторичных продуктов липопероксидации по [3], а также с использованием реагентов «ТБК-АГАТ» (ООО «АГАТ-МЕД», Россия), активность супероксиддисмутазы (СОД, КФ 1.15.1.1,

реагенты «RANSOD», производитель «Randox Laboratories LTD.»), глутатионпероксидазы (ГПО, КФ 1.11.1.9, реагенты «Glutation Peroxidasa» того же производителя) и каталазы (КФ 1.11.1.6) по [9].

Для оценки когнитивных функций мозга использовали тест «Распознавание новых объектов» по P.V. Mello et al. в модификации [5] с оценкой кратковременной и долговременной памяти. Видеорегистрацию отдельных поведенческих актов осуществляли с помощью видеокамеры SONY SSC-G118. Состояние функций памяти определяли как дискриминационное время исследования нового объекта (DIR) по формуле:

$$DIR = \frac{t \text{ исследования нового объекта} - t \text{ исследования знакомого объекта}}{\text{общее } t \text{ исследования во время сеанса тестирования}} \times 100$$

Статистическая обработка данных включала определение средних значений и среднеквадратичных отклонений $M \pm \sigma$. В группах выборки при нормальном распределении признака (по критерию Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка) результаты обрабатывали с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA, post-hoc анализа и теста Бонферрони. При наличии ассиметрического распределения признаков применяли непараметрические критерии множественного сравнения Крускала-Уоллиса и Данна. Для выявления статистических связей между выраженностью признаков использовали непараметрический анализ с расчетом коэффициентов корреляции рангов по Спирмену. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Количество крысят на одну самку в 10 пометах в обеих группах достоверно не отличалось, хотя их было несколько меньше в опытной группе: контрольная – $9,25 \pm 0,80$, опытная – $8,75 \pm 1,04$. Крысята опытной группы статистически значимо отставали в массе тела. У потомства гипотиреозных животных выявились также изменения гормонального статуса, характерные для недостаточности функции щитовидной железы (табл. 1).

Таблица 1

Содержание гормонов тиреоидной системы в плазме крови у крысят-самцов двухмесячного возраста – потомства крыс с мерказолиловым гипотиреозом, $M \pm \sigma$

Гормоны	Группа животных, n=10		p
	контрольная	опытная	
ТТГ, мМЕ/л	$1,03 \pm 0,05$	$1,41 \pm 0,20$	0,0001
оТ ₄ , нмоль/л	$72,2 \pm 4,88$	$62,2 \pm 4,82$	0,0001
сТ ₄ , моль/л	$15,2 \pm 1,28$	$13,2 \pm 0,81$	0,0027

Результаты определения первичных (диеновые конъюгаты, ДК) и вторичных (кетодиены и сопряженные триены, КДиСТ) продуктов перекисного окисления ацилов

нейтральных (гептановая фаза) и бифильных (изопропаноловая фаза экстракта) липидов, а также соединений, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-РС) в ткани головного мозга у крысят, рожденных от родителей с экспериментальным гипотиреозом, свидетельствуют об увеличении их содержания (табл. 2). Так, концентрация первичных продуктов липопероксидации в гептановой фазе липидного экстракта головного мозга была на 38,4%, в изопропаноловой фазе – на 36,2% выше, чем в группе контроля.

Таблица 2

Содержание продуктов липопероксидации в ткани головного мозга у потомков крыс, перенесших экспериментальный гипотиреоз, $M \pm \sigma$

Группа животных	Показатели, усл. ед.				ТБК-РС, нмоль/г ткани
	Гептановая фаза		Изопропаноловая фаза		
	ДК	КД и СТ	ДК	КД и СТ	
контрольная, n=10	0,32±0,04	0,19±0,03	0,60±0,06	0,16±0,02	2,13±0,21
опытная, n=10	0,43±0,07 p=0,0004	0,22±0,02 p=0,0419	0,82±0,08 p=0,0002	0,23±0,03 p=0,0002	2,52±0,16 p=0,0022

Усиление процессов перекисного окисления липидов в ткани мозга наблюдалось на фоне снижения активности основных ферментов антиокислительной защиты (таблица 3). Активность фермента первой линии защиты от действия активных форм кислорода – СОД оказалась сниженной до 87,4%, а активность ГПО – до 76,0%, каталазы – до 79,0% от контроля, характеризуя наличие определенного дисбаланса активности СОД и ферментов второй линии защиты – ГПО и каталазы, что может сопровождаться повышением уровня H_2O_2 в ткани мозга у животных опытной группы и его негативным действием на клетки, учитывая его свойства прооксиданта и способность проходить через биологические мембраны. Некоторые отделы мозга обладают повышенной чувствительностью к активным формам кислорода, и окислительный стресс является ранним патологическим проявлением расстройства функционального состояния ЦНС и нейродегенеративных изменений при старении, развитии сосудистой деменции, депрессии, эпилепсии, болезни Дауна, болезни Альцгеймера [7].

Таблица 3

Активность ферментов антиоксидантной защиты в ткани головного мозга потомков крыс, перенесших мерказолиловый гипотиреоз, $M \pm \sigma$

Ферменты	Группа животных, n=10		p
	контрольная	опытная	
СОД, Ед/мг белка	1,35±0,05	1,18±0,12	p=0,0096
ГПО, Е/мг белка	0,50±0,07	0,38±0,03	p=0,0003
каталаза, мкмоль/ мин·мг белка	0,86±0,08	0,68±0,05	p=0,0008

Анализ поведенческих реакций в тесте «Распознавание новых объектов» в наших исследованиях у крысят показал, что перенесенный родителями мерказолиловый гипотиреоз

не оказывает влияния на двигательную активность потомства, как и на поведение животных в тренировочную сессию (табл. 3). Однако при предъявлении нового объекта крысы контрольной группы тратили минимальное время на исследование знакомого и значительно больше времени – нового объекта, в то время как животные опытной группы не отдавали явного предпочтения новому объекту как через 10 минут после предъявления, так и через 24 часа, что выразилось в значительном снижении DIR (табл. 4), указывая на значительную степень нарушения как кратковременной (тестирование через 10 мин), так и долговременной памяти (тестирование через 24 часа).

Таким образом, у потомства животных, спаривание и беременность самок которых происходили непосредственно сразу после развития мерказолилового гипотиреоза, выявляются нарушения функционального состояния щитовидной железы, что, вероятно, связано с истощением интертиреоидного содержания йода с изменением его метаболизма в тироцитах с недостаточной секрецией тиреоидных гормонов у матери в периодах гестации и лактации, постнатального развития крысят. В литературе имеются указания на интенсификацию липопероксидации при развитии гипотиреоза в клинических условиях [11] и при экспериментальном моделировании [8]. Дисбаланс в системе про-/антиоксиданты при дисфункции щитовидной железы связывают с процессами расходования резервов и недостаточности антиоксидантной защиты, которые протекают на фоне вторичной активации ПОЛ.

Таблица 4

Средние значения дискриминационного времени исследования нового объекта (DIR) в различные фазы эксперимента, $M \pm \sigma$

Группа животных	DIR, %		p
	Тестирование через 10 мин	Тестирование через 24 часа	
контрольная n=10	1,35±0,05	1,18±0,12	<0,0001
опытная, n=10	0,50±0,07	0,38±0,03	<0,0001

В наших исследованиях гипотиреоз у потомства крыс также приводит к снижению когнитивной функции с нарушениями кратковременной и долговременной памяти с увеличением в ткани головного мозга продуктов ПОЛ и снижением активности антиоксидантных ферментов – СОД, ГПО и каталазы. Одним из патогенетических механизмов нарушений когнитивных функций при гипотиреозе, по всей вероятности, является развитие окислительного стресса в ткани мозга. На взаимосвязь этих процессов указывают и результаты корреляционного анализа между показателями когнитивных функций и активности ферментов антиокислительной защиты ткани головного мозга у потомства крыс с экспериментальным гипотиреозом (табл. 5).

Таблица 5

Коэффициенты корреляции рангов по Спирмену показателей теста «Распознавание новых объектов» с активностью антиоксидантных ферментов ткани головного мозга у потомства крыс, перенесших экспериментальный гипотиреоз

Ферменты	Время распознавания новых объектов в % ко времени исследования	
	Тестирование через 10 минут	Тестирование через 24 часа
СОД	0,457, p=0,0111	0,502, p=0,0052
ГПО	0,651, p=0,0009	0,729, p=0,0007
Каталаза	0,560, p=0,0010	0,645, p<0,0008

Заключение

Результаты исследования демонстрируют снижение когнитивных функций у потомства родителей с гипофункцией щитовидной железы, свидетельствующие о негативном влиянии йодного дефицита на тиреоидный статус, тканевой метаболизм головного мозга, обуславливая метаболические и, вероятно, морфологические изменения структур центральной нервной системы на этапах дифференцировки и созревания мозга, которые в дальнейшем трансформируются в нарушение интеллектуального развития потомства с изменениями окислительного метаболизма.

Литература

1. Аналитический обзор результатов мониторинга основных эпидемиологических характеристик йододефицитных заболеваний у населения РФ за период 2009-2015 гг. / Е.А. Трошина [и др.] // Проблемы эндокринологии. 2018. Т. 64. № 1. С. 21-37.
2. Белых Н.А. Йодный дефицит и интеллект ребенка: механизмы негативного влияния и пути профилактики / Н.А. Белых // Наука молодых. 2017. № 2. С. 251-264.
3. Волчегорский И.А., Долгушин И.И., Колесников О.Л. Цейликман В.Э. Экспериментальное моделирование и лабораторная оценка адаптивных реакций организма. Челябинск: изд-во ЧГПУ, 2000. 152 с.
4. Выбор способа применения и дозы тиамазола для моделирования гипотиреоза у лабораторных крыс / Ф.Х. Камилов [и др.] // Биомедицина. 2018. № 1. С. 59-70.
5. Горелов П.И. Оценка прокогнитивного эффекта дилепта и его основного метаболита ГЗР-125 в тесте распознавания объектов у крыс // П.И. Горелов, Р.У. Островская, Н.М. Сазонова // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2013. Т. 76. № 7. С. 3-5.
6. Дёмин Д.Б. Эффекты тиреоидных гормонов в развитии нервной системы (обзор) / Д.Б. Демин // Журнал медико-биологических исследований. 2018. № 6(2). С. 115-127.
7. Дубинина Е.Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, создание и разрушение). Физиологические и клинико-биохимические аспекты. М.: Медицинская пресса, 2006. 400 с.

8. Коноплянко В.А. Патофизиологические процессы при гипотиреозе в эксперименте / В.А. Коноплянко, Р.Д. Клебанов // Здоровье и окружающая среда. 2015. Т 25. № 2. С.102-105.
9. Метод определения активности каталазы / Королюк М.А. [и др.] // Лабораторное дело. 1988. № 1. С. 16-19.
10. Муравьева А.Б. Экспериментальная модель гипотиреоза. Оценка эффективности экспериментальной модели гипотиреоза / А.Б. Муравьева, Е.В. Пажитнева // Национальная ассоциация ученых. 2016. Т. 19. № 3 С. 44-45.
11. Сравнительный анализ состояния про-/антиоксидантной защиты у пациентов с дисфункцией щитовидной железы различного генеза / Е.И. Ременякина [и др.] // Современные проблемы науки и образования. 2014. №2. <http://www.science-education.ru/116-12596>.
12. Zimmermann M.B. The effects of iodine deficiency in pregnancy and infancy / M.B. Zimmermann // Paediatr. Perinat. Epidemiol. 2012. Vol. 26, Suppl 1. P. 108-17.

Сведения об авторах статьи:

Рахматуллина Лилиана Фавадисовна – ассистент кафедры патофизиологии Башкирского государственного медицинского университета, dear_myl@mail.ru

Байбурина Дина Эльгизовна – студентка третьего курса педиатрического факультета Башкирского государственного медицинского университета.

Камилов Феликс Хусайнович – д.м.н., профессор кафедры биологической химии Башкирского государственного медицинского университета.

Гребнев Дмитрий Юрьевич – доктор медицинских наук, заведующий кафедрой патологической физиологии Уральского государственного медицинского университета, г. Екатеринбург.

Валиуллина Л.А., Бикметов К.А., Бикметова Э.Р., Меньшикова И.А.
БИОХИМИЧЕСКАЯ РОЛЬ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ В РАЗВИТИИ ДЕТЕЙ
Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа

Роль микроэлементов таких как цинк, йод, хром, селен в физиологии ребёнка, является одним из актуальных вопросов. Анализ литературных данных о роли микроэлементов в жизнедеятельности детей и последствиях при их дефиците и избытке.

Ключевые слова: эссенциальные микроэлементы; питание; дефицит; избыток.

Valiullina L.A., Bikmetov K.A., Bikmetova E.R., Menshikova I.A.
THE BIOCHEMICAL ROLE OF TRACE ELEMENTS IN THE DEVELOPMENT OF CHILDREN
Bashkir state medical University, Ufa

The role of trace elements such as zinc, iodine, chromium, selenium in the physiology of the child is one of the most pressing issues. Analysis of literature data on the role of trace elements in the life of children and the consequences of their deficiency and excess.

Keywords: essential trace elements; nutrition; deficiency; excess.

Физиологическая роль микроэлементов в организме человека начала изучаться относительно недавно, когда В.И. Вернадский в 1891 году указал на тесную связь химического состава земной коры и живых организмов, в том числе и людей. Он предполагал, что имеется круговорот этих веществ в природе: химические соединения отражают схожесть организма с природой и в то же время определяют его индивидуальность. Данная гипотеза привлекла внимание и медицинских исследователей, с того момента началось бурное изучение значения микроэлементов не только в патологических, но и в физиологических процессах.

Так что же такое микроэлементы? Это химические элементы, которые содержатся в организме в очень малых концентрациях (от 0,00001% до 0,01% по массе), они необходимы для протекания жизненно-важных процессов в живых организмах. Около 81 химических элементов обнаружены в организме человека. Из этого количества лишь один процент приходится на эссенциальные (то есть жизненно необходимые) элементы: йод, цинк, хром, селен, медь, железо, никель, фтор, кремний, литий, марганец, молибден, кобальт, ванадий, мышьяк. Они находятся в очень малом количестве, но оказывают огромную роль, влияя на физиологическое состояние организма.

Недостаточное или избыточное поступление этих веществ может привести к микроэлементозам – это крайне тяжелые заболевания, имеющие генетическую, природную, техногенную этиологию. Количество микроэлементов зависит от их содержания в продуктах, в окружающей среде и от их соотношения с другими веществами. Любой дисбаланс оказывает влияние на всасывание микроэлементов в просвете кишечника, что влияет на ферментативные процессы, механизмы которых были раскрыты относительно недавно.

Первый год жизни малыша является самым уязвимым, поэтому нужно предотвратить дефицит важнейших минеральных веществ, чтобы предупредить развитие болезней.

Значение таких микроэлементов как цинк, йод, хром, селен в организме новорожденного изучен в наибольшей степени. Рассмотрим каждый из них.

Цинк входит в состав многих ферментов: карбоангидразы, алкогольдегидрогеназы, карбоксипептидазы поджелудочной железы, щелочной фосфатазы, нуклеотидилтрансферазы, в РНК- и ДНК-полимераз, тем самым обеспечивает нормальное течение физиологических процессов: влияние на белковый, углеводный и жировой (липотропный эффект) обмен веществ, на окислительно-восстановительные процессы, синтез нуклеиновых кислот и белков, экспрессию генов, обеспечение стабильности ДНК, РНК и рибосом. В первый год жизни цинк нужен для становления и функционирования кишечника, принимая участие в регуляции всасывания электролитов и воды; для антиоксидантной защиты, входя в состав супероксиддисмутазы (СОД); для работы иммунной системы малыша.

Суточная потребность цинка для взрослого человека – 15 мг, для детей – от 3 до 12 мг. Наиболее богаты цинком грудное молоко, пшеничные, рисовые и ржаные отруби, зерна злаков и бобовых, какао и др.

Новорожденные получают цинк через молоко матери (который связан с лактоферрином) или смеси. Грудное вскармливание обеспечивает адекватный уровень поступления цинка в организм ребенка, это связано с протективным эффектом к дефициту цинка, что обеспечивается благодаря легкоусвояемости. А при искусственном вскармливании смесями на основе коровьего молока (связан с казеином) наблюдается экзогенный недостаток цинка. Однако не только поступление, но и всасывание имеет большое значение, потому что оно происходит лишь в присутствии таких аминокислот как глицин, цистеин, лизин, глутаминовой кислоты, поэтому нельзя забывать о том, что при недостаточности белков кишечное всасывание этого микроэлемента снижается. Немаловажную роль в всасывании цинка имеют клетчатка, медь (в энтероцитах идет конкурентная адсорбция), железо, кальций, витамин А (способствует лучшему связыванию цинка с белком) и интерлейкин 1 (на фоне воспаления). Цинк также необходим для синтеза транспортера витамина А – ретинолсвязывающего белка.

В основном цинк экскретируется кишечником: небольшая часть (0,4-2,8 мг/сут) выводится калом, большая – обратно реабсорбируется.

Дефицит цинка при беременности может привести к порокам развития плода. У женщины возможны преждевременные роды и атонические кровотечения. В течение

последнего месяца беременности в печени у плода накапливается цинк, и если не кормить грудью недоношенного ребенка, то немедленно развивается его недостаток (при суточной потребности 600-800 мкг/кг). Даже незначительный дефицит цинка в питании новорожденного может привести к задержке физического и психического развития.

Аутосомно-рецессивное нарушение метаболизма цинка приводит к развитию энтеропатического дерматита, когда уровень белка, связывающего цинк в желудочно-кишечном тракте больных детей, дефектные или низкие, что приводит к развитию мальабсорбции цинка (в частности, нарушается транспорт цинка через энтероцит). При этом у малыша нарушается синтез жиров, аминокислот, в частности триптофана, поэтому в клетках накапливаются триглицериды. Однако у новорожденных детей, которых кормят грудным молоком, нет симптомов болезни до прекращения естественного вскармливания. Как только мать перестает давать грудное молоко, у ребенка проявляется болезнь: в первую очередь, наблюдается нарушение работы желудочно-кишечного тракта (частый стул с неприятным запахом), вокруг рта, глаз и анального отверстия появляется эритематозная сыпь, которая впоследствии распространяется на симметричные участки конечностей и тела, возможны осложнения в виде вторичных инфекций (из-за снижения функции иммунной системы), появление эрозий и язвочек. Могут наблюдаться выпадения ресниц и бровей, отслаивание и отторжение ногтей, отставание в росте и развитии психики. Лечение: необходимо провести курс введения цинка.

Потеря цинка может наблюдаться и при кистозном фиброзе, синдроме короткого кишечника, хронической инфекционной диарее, дефиците эссенциальных жирных кислот, биотина, нарушениях цикла мочевины, здесь также наблюдаются высыпания на коже (утолщение эпидермиса) быстрое утомление и перевозбуждение младенца.

Дефицит цинка приводит к усиленному накоплению меди, железа, кадмия, свинца. Избыток приводит к дефициту ранее перечисленных веществ и задерживает рост, нарушает минерализацию костей.

Йод является структурным компонентом тиреоидных гормонов щитовидной железы. Этот микроэлемент регулирует активность течения многих метаболических процессов в нашем организме. В детском возрасте тиреоидные гормоны (Т3 и Т4) стимулируют образование энергии, синтез белков, повышают метаболизм углеводов и потребность тканей в кислороде, усиливают распад жиров, стимулируют деятельность центральной нервной системы. Под их влиянием происходит рост и дифференцировка тканей организма (в частности, нервной) созревают мозжечок и гиппокамп, формируются синапсы,

закладываются основные церебральные функции, происходит глиогенез, миелиногенез и миелинизация отростков нейроцитов.

Согласно данным ВОЗ для новорожденных суточная потребность йода –50 мкг; для детей – 90-150 мкг; для беременных и кормящих женщин — 250мкг, для взрослых — 150-200 мкг. Йод содержится в таких продуктах как бурая морская водоросль, морепродукты, рыба, яйца, овощи: картофель, морковь, лук.

Недостаток йода во внутриутробном периоде может привести к самопроизвольному аборту, врожденным аномалиям, мертворождению. При дефиците йода у новорожденных наблюдается гипотиреоз, зоб, резко изменяется структура тела: останавливается рост, мозг не развивается из-за дегенеративных изменений, отмечается умственная отсталость (кретинизм, который сочетается с косоглазием и глухонемой) – нарушаются когнитивные функции головного мозга, ухудшаются моторика ребенка. При гипертиреозе наблюдается избыток йода, который может привести к развитию Базедовой болезни с сопутствующими признаками: повышение обмена веществ, тахикардия, экзофтальм, повышенная раздражительность, похудание, диарея, потливость, ухудшение состояния кожи, гипертермия, мышечная слабость вплоть до их атрофии.

Проблема дефицита йода актуальна для многих регионов России, и в частности для Республики Башкортостан. Наша республика относится к регионам, эндемичным по зубу. Так как Башкортостан является очагом дефицита йода, из-за его пониженного содержания в окружающей среде (регион находится высоко над уровнем моря), то на каждого жителя потребление йода составляет 40-80 мкг в день, это ниже рекомендуемого уровня в 2-3 раза (150-200 мкг).

Особое значение у грудных детей и детей раннего возраста имеет профилактика дефицита йода. Если новорожденный находится на грудном вскармливании, то йод в достаточном количестве поступает в организм ребенка с грудным молоком, но мама должна употреблять 200 мкг йодида калия ежедневно. Начиная с шести месяцев, нужно вводить в прикорм йодированные каши (около 25 мкг/сут). С 9-го месяца доза йодида калия увеличивается до 50 мкг/сут. Если ребенок находится на искусственном вскармливании, то используются йодированные смеси.

Постоянной составной частью органов и тканей человека является хром. Микроэлемент принимает участие в обмене углеводов, превращая его излишки в жиры, входит в состав фактора толерантности и вместе с инсулином обеспечивает постоянство глюкозы в крови, так же входит в состав нуклеиновых кислот, обеспечивая целостность их молекул. Хром регулирует функционирование кровеносных сосудов и работу сердца. При

нормальном количестве принимает участие в выведении из организма токсинов, радионуклидов и солей тяжелых металлов.

Хром лучше всасывается в присутствии щавелевой кислоты и при сахарном диабете; хуже, если в пище содержится повышенное количество железа, цинка и фитиновой кислоты. Образуя комплексы с цистеином, глицином, глутаминовой и никотиновой кислотами, хром способствует оптимальному их поглощению в тонком кишечнике. В крови переносится трансферрином. Хром замещает недостаток йода в ТГ, накапливаясь в щитовидной железе.

Суточная норма потребления хрома не установлена, предполагается, что 50-200 мкг. В тканях новорожденных (в печени, почках, волосах) концентрация хрома значительно выше, чем в старшем возрасте. Источники хрома – грудное молоко, мясо, яйца, брокколи, продукты из цельных злаков, зеленые бобы, моллюски и другие.

При недостатке хрома наблюдается дефицит массы тела, нейропатии, нарушается толерантность к глюкозе. Самое главное требуется обеспечить нужным количеством хрома детей, которые находятся на искусственном вскармливании, поэтому к заменителям женского молока предъявляются соответствующие требования.

При избыточном поступлении (например, при недостатке железа и цинка или при повышенной концентрации в воздухе) хром токсичен (порог – 5 мг/день). Это может быть причиной головных болей, воспалительных изменений слизистой желудочно-кишечного тракта, похудения, различных кожных заболеваний – дерматитов и экзем.

Значение селена для организма в настоящее время активно изучается. Известно, что этот микроэлемент входит в состав ключевого фермента антиоксидантной системы организма – глутатионпероксидазы, которая обеспечивает окисление глутатиона, имеющего в своем составе сульфгидрильную группу, перенося при этом электрон сначала на селенол, затем на перекись, в результате образуется вода. Селенол через селенистую кислоту вновь регенерируется. Глутатионпероксидаза находится в тесном взаимодействии с токоферолом и с другими компонентами антиоксидантной системы. Высокие дозы селена могут компенсировать нехватку витамина Е.

Селен принимает активное участие в регуляции активности гемоксигеназы, цитохрома P450 и ряда других цитозольных и митохондриальных ферментов. Кроме того, селен защищает организм от тяжелых металлов, способствует поддержанию эластичности тканей и устраняет появление перхоти.

Суточные нормы селена составляют: для новорожденных – 6 мг/сут; для детей – 9-12 мг/сут; для женщин – 50 мкг; 70 мкг – для мужчин. Грудное вскармливание полностью обеспечивает потребности, нежели искусственное.

Источники селена: грудное молоко, брокколи, помидоры, лук, морепродукты, отруби, злаковые. Кроме того, этот эссенциальный элемент может поступать в организм через кожу и легкие.

Дефицит селена приводит к нарушению функции многих систем: в организме усиленно накапливаются кадмий и мышьяк, которые, повторно усугубляют дефицит селена. Недостаток селена имеет значение при многих патологических деструктивных и воспалительных процессах в организме, в качестве антиканцерогенного фактора. Эндемичные регионы в России – Забайкалье, Ярославская область и Удмуртия.

Избыток может привести к дефициту кальция. В больших количествах приводит к двум формам поражения – к холецисто- и гепатопатии и к изменениям нервно-мышечного аппарата (судороги, боли в конечностях, чувство онемения).

Растущий молодой организм требует тщательный подход к изучению роли эссенциальных микроэлементов в норме и при патологии, от которых зависит закладка здоровья ребенка на протяжении всей жизни. Необходимо вводить в пищевой рацион новорожденных нужное количество этих веществ по возрасту и учитывать их сбалансированность, чтобы не было побочных эффектов при взаимном всасывании.

Литература

1. Авцын А.П. Микроэлементозы человека. М.: Медицина, 1991. 496 с.
2. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия. - М.: Медицина, 2008.- 178 с.
3. Гмошинский И.В. Минеральные вещества в питании человека. Селен: всасывание и биодоступность // Вопросы питания. 2006. Т. 75, № 5. С. 15-21
4. Дефицит йода — угроза здоровью и развитию детей России. Пути решения проблемы: Национальный доклад. — М., 2006. — С. 36.
5. Евсеева Г.П. Микроэлементный статус и взаимосвязь его дисбаланса с развитием заболеваний у детей: автореф. дис. ... докт. мед. наук. Хабаровск, 2009. 43 с.
6. Малкоч А.В., Бельмер С.В., Карманов М.Е. и др. Дефицит йода и его профилактика // Вопросы детской диетологии. — 2008. — Т. 8, № 2. — С. 36–40.
7. Ребров В.Г., Громова О.А. Витамины, макро- и микроэлементы // Обучающие программы РСЦ института микроэлементов ЮНЕСКО. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. 955 с
8. Тутельян В.А., Княжев В.А., Хотимченко С.А., Голубкина Н.А., Кушлинский Н.Е., Соколов Я.А. Селен в организме человека: метаболизм, антиоксидантные свойства, роль в канцерогенезе. М.: Издательство РАМН, 2002. 224 с.

Сведения об авторах статьи:

Валиуллина Лилия Альбертовна – студентка 3 курса педиатрического факультета, кафедра биологической химии ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет, РФ, г.Уфа, ул. Ленина 3. e-mail: valiullina.liliya01@mail.ru

Бикметов Камиль Альбертович – студент 1 курса лечебного факультета, кафедра биологической химии ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет, РФ, г.Уфа, ул. Ленина 3. e-mail: eh19202082@yandex.ru

Бикметова Эльвира Рафинатовна – кандидат биологических наук, доцент кафедры биологической химии ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет, г.Уфа, ул. Ленина 3. e-mail: eh19202082@yandex.ru

Меньшикова Ирина Асхатовна - кандидат медицинских наук, доцент кафедры биологической химии ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет, г.Уфа, ул. Ленина 3 e-mail: eh19202082@yandex.ru

Галимова С.Ш.

ЗАГРЯЗНЕНИЕ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ И МУЖСКОЕ БЕСПЛОДИЕ: ВВЕДЕНИЕ В ПРОБЛЕМУ

Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа

Широкое распространение мужского бесплодия и тенденция к снижению качества спермы в большинстве стран коррелируют со степенью индустриализации и связаны с выбросами экополлютантов в окружающую среду. Люди неизбежно подвергаются воздействию повсеместно распространенных загрязнителей, которые обладают способностью вмешиваться в функционирование репродуктивных органов. Исследовано влияние экополлютантов на сперматогенез, стероидогенез, клетки Сертоли, гемато-тестикулярный барьер и функции сперматозоидов. Репротоксические эффекты включают изменения в сперматогенезе и стероидогенезе, активацию апоптоза, снижение жизнеспособности клеток Лейдига, нарушение структуры и функции клеток Сертоли, измененную экспрессию стероидных рецепторов, индукцию перекисного окисления и эпигенетические изменения, приводящие к ухудшению качества и функции сперматозоидов.

Ключевые слова: мужское бесплодие, сперма, ксенобиотики.

Galimova S.Sh.

ENVIRONMENTAL POLLUTION AND MALE INFERTILITY: AN INTRODUCTION TO THE PROBLEM

Bashkir State Medical University, Ufa

The widespread prevalence of male infertility and the downward trend in sperm quality in most countries correlates with the degree of industrialization and is associated with the release of eco-pollutants into the environment. Humans are inevitably exposed to ubiquitous pollutants that have the ability to interfere with the functioning of the reproductive organs. The effect of ecopollutants on spermatogenesis, steroidogenesis, Sertoli cells, blood-testicular barrier and sperm function was studied. Reprotoxic effects include changes in spermatogenesis and steroidogenesis, activation of apoptosis, decreased viability of Leydig cells, disruption of the structure and function of Sertoli cells, altered expression of steroid receptors, induction of peroxidation, and epigenetic changes leading to impairment of sperm quality and function.

Key words: male infertility, sperm, xenobiotics.

В настоящее время имеет место существенный прогресс в области изучения молекулярных и генетических основ мужской фертильности, механизмов регуляции функции различных отделов репродуктивной системы в норме и патологии, прежде всего, при бесплодии, роли явлений апоптоза, свободнорадикального окисления, а также многочисленных системных и локальных факторов в контроле процессов андрогенопоэза, сперматогенеза, оплодотворения и др. [1,5,7,8,13,20].

Существует несколько причин устойчивого роста интереса к проблемам репродуктивного здоровья мужчин. Во-первых, это совершенствование методов экстракорпорального оплодотворения, в частности, широкое внедрение процедуры интрацитоплазматической инъекции сперматозоидов. Во-вторых, это продолжение исследований по созданию надежных и безопасных методов мужской контрацепции. Наконец, в-третьих, это появление в научной литературе сообщений о снижении количества и качества спермы и росте случаев урогенитальной патологии в некоторых регионах мира в конце XX века [23, 24].

Показательно, что наиболее выраженные изменения обнаружены у мужчин, проживающих в промышленных странах и регионах. Маркерными эффектами техногенного

прессинга на детородную систему мужчин являются задержка полового созревания, угнетение сперматогенеза, рост злокачественных новообразований яичка, увеличение распространенности аденомы и рака предстательной железы, смещение соотношения рожденных детей (sex ratio) в пользу девочек, а также резкий подъем в последние десятилетия частоты таких врожденных нарушений, относящихся к симптомам феминизации, как крипторхизм и гипоспадия [2, 3, 6, 14, 18, 21].

Загрязнители окружающей среды включают широкий спектр химических веществ, таких как пестициды, гербициды, удобрения, полихлорированные бифенилы, полициклические ароматические углеводороды, фталаты, бисфенолы, пластификаторы, поверхностно-активные вещества, тяжелые металлы, а также сточные воды, сбрасываемые с производственных установок [25]. Всего более восьмидесяти тысяч новых ксенобиотиков поступили в окружающую среду за последние сто лет. Они повсеместно распространены в экосистемах и проникают в организм человека через пищевые цепи. Большинство загрязнителей окружающей среды были обнаружены в воде, сточных водах, донных отложениях, а также в пище и организме человека и диких животных как на низком, так и на высоком уровне.

Повсеместное присутствие загрязнителей окружающей среды и их способность вмешиваться в репродуктивное развитие и функции мужчин хорошо задокументированы [4, 9, 10, 12, 15, 16, 17, 26].

Ключевые моменты репротоксического действия ксенобиотиков:

- Загрязнители окружающей среды играют значительную роль в росте заболеваемости мужским бесплодием.
- Различные загрязнители окружающей среды нарушают стероидогенез яичек посредством прямого или опосредованного рецепторами ингибирования и/или индуцирования окислительного стресса.
- Загрязнители окружающей среды нарушают сперматогенез, функцию клеток Сертоли и целостность гематоэнцефалического барьера.
- Эпигенетические механизмы участвуют в трансгенерационном наследовании репродуктивных нарушений, вызванных загрязнителями окружающей среды.

Потенциальные области дальнейших исследований [11, 19, 22]:

- Продолжение эпидемиологических исследований по выявлению корреляций между концентрацией загрязняющих веществ в окружающей среде и качеством спермы, что необходимо для поиска прогностических биомаркеров определения воздействия загрязняющих веществ на человека.
- Эпигенетические и трансгенерационные эпигенетические маркеры воздействия

окружающей среды могут быть определены в будущем путем анализа образцов спермы лиц, подвергшихся профессиональному воздействию (а также их потомства).

• Особое значение и дополнительную ценность будут иметь исследования, посвященные синергетическому воздействию различных загрязняющих веществ, поскольку в реальной повседневной жизни в организм человека поступают сложные многокомпонентные смеси поллютантов.

Литература

1. Варикоцеле и репродуктивная функция: эпидемиология и риск развития бесплодия (данные обследования 3908 мужчин) / В.А. Божедомов, А.Б. Шомаруфов, Г.Е. Божедомова и др. // Урология. 2021. № 3. С. 122-128.
2. Галимов Ш.Н. Гормонально-метаболические механизмы нарушения мужской репродуктивной функции при экспериментальной интоксикации диоксинсодержащим гербицидом 2,4-ДА: автореф. дис... д-ра мед. наук. Уфа, 2000.
3. Галимова Э.Ф. Молекулярные механизмы нарушения мужской репродуктивной функции при интоксикации полихлорбифенилами: дис... канд. мед. наук. Уфа, 2003.
4. Галимов Ш.Н., Галимова Э.Ф. Мужчина в зеркале эволюции, экологии, экономики и эмансипации. Экология и жизнь. 2010. № 5. С. 78-83.
5. Галимов Ш.Н., Валеева Г.Р. Влияние экотоксикантов группы 2,4-д на сперматогенез и плодовитость белых крыс. Авиакосмическая и экологическая медицина. 1999. Т. 33. № 1. С. 32-34.
6. Грицаенко Д. В. Развитие репродуктивной системы: дифференцировка пола. Вестник Башкирского государственного медицинского университета. 2020. № 5. С. 13-22.
7. Мужское бесплодие: молекулярные и иммунологические аспекты / Ш.Н. Галимов, В.А. Божедомов, Э.Ф. Галимова и др. М: ГЭОТАР-Медиа, 2020.
8. Особенности ферментного профиля и энергетического статуса спермальной плазмы при идиопатическом бесплодии / Э.Ф. Галимова, В.Н. Павлов, А.З. Абдуллина, Ш.Н. Галимов // Проблемы репродукции. 2013. Т. 19. № 1. С. 66-69.
9. Сравнительный анализ антиоксидантных эффектов коэнзима q и l-карнитина у мужчин с идиопатической патоспермией / В. Н. Павлов, Э. Ф. Галимова, В. А. Катаев и др. Медицинский вестник Башкортостана. 2013. Т. 8. № 6. С. 161-163.
10. Эндокринные дизрапторы и бесплодие / С.В. Чигринец, Г.В. Брюхин. Челябинск: Издательский центр "Титул", 2020.
11. Agarwal A., Baskaran S., Parekh N. et al. Male infertility. Lancet. 2021;397(10271):319-333.
12. Aging-induced changes in sperm DNA methylation are modified by low dose of perinatal flame

- retardants / J. Pilsner, A. Shershebnov, H. Wu et al. // *Epigenomics*. 2021;13(4):4.
13. Asadi A., Ghahremani R., Abdolmaleki A., Rajaei F. Role of sperm apoptosis and oxidative stress in male infertility: A narrative review. *Int. J. Reprod. Biomed.* 2021;19(6):493-504.
14. Delbes G., Hales B., Robaire B. Toxicants and human sperm chromatin integrity. *Mol. Hum. Reprod.* 2010;16:14-22.
15. Indices of Reproductive Health of Male Population in the Increased Risk Zones of Dioxin Exposition / Sh. Galimov, Z. Amirova, E. Kruglov, E. Galimova // *Organohalogen Compounds*. 2002;59:377-379.
16. Jeng H. Exposure to endocrine disrupting chemicals and male reproductive health. *Frontiers in Public Health*. 2014;2:55.
17. La Rocca C., Tait S., Guerranti C. et al. Exposure to endocrine disruptors and nuclear receptors gene expression in infertile and fertile men from Italian areas with different environmental features. *International Journal Environmental Research Public Health*. 2015;12(10):12426–12445.
18. Mocarelli P., Gerthoux P., Ferrari E. et al. Paternal concentrations of dioxin and sex ratio of offspring. *Lancet*. 2000;355:1858-1863.
19. Panner Selvam M., Finelli R., Agarwal A., Henkel R. Proteomics and metabolomics - Current and future perspectives in clinical andrology. *Andrologia*. 2021;53(2):e13711.
20. Pantos K., Grigoriadis S., Tomara P. et al. Investigating the Role of the microRNA-34/449 Family in Male Infertility: A Critical Analysis and Review of the Literature. *Front Endocrinol.* 2021;12:709943.
21. Peripubertal serum concentrations of organochlorine pesticides and semen parameters in Russian young men / R. Abou Ghayda, O. Sergeyev, Y. Dikov et al. // *Environment International*. 2020;144:106085.
22. Rotondo J., Lanzillotti C., Mazziotta C. et al. Epigenetics of Male Infertility: The Role of DNA Methylation. *Front. Cell Dev. Biol.* 2021;9:689624.
23. Selvaraju V., Baskaran S., Agarwal A., Henkel R. Environmental contaminants and male infertility: Effects and mechanisms. *Andrologia*. 2021;53(1):e13646.
24. Skakkebaek N., Rajpert-De Meyts E., Buck Louis G. et al. Male reproductive disorders and fertility trends: Influences of environment and genetic susceptibility. *Physiological Reviews*. 2016;96(1), 55–97.
25. Sprovieri M., Feo M., Prevedello L. et al.. Heavy metals, polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in surface sediments of the Naples harbour (southern Italy). *Chemosphere*. 2007;67(5),998–1009.
26. Stukenborg J., Mitchell R., Söder O. Endocrine disruptors and the male reproductive system.

Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab. 2021:101567.

Сведения об авторе статьи:

Галимова Саида Шамилевна – ассистент кафедры патологической физиологии, Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа, ул. Ленина 3, e-mail: saida9319@mail.ru

Гайковая Л.Б.¹, Стюф И. Ю.¹, Улейская Г.И.², Сяпина Т.В.¹, Евтеева Д.А.¹, Власова Ю.А.¹,
Малахова М.Я.¹

ЛИПИДЫ КРОВИ И КЛЕТОЧНЫЙ ИММУНИТЕТ У ПАЦИЕНТОВ С COVID-19 В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ ЗАБОЛЕВАНИЯ

¹ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Санкт-Петербург

²Городская клиническая больница №31, г. Санкт-Петербург

Представлены результаты зависимости тяжести состояния пациентов с COVID-19 от уровня холестерина и его фракций и различных субпопуляций лимфоцитов в крови.

Ключевые слова: COVID-19, холестерин, SARS-COV-2, субпопуляции лимфоцитов.

Gaikovaya L.B.¹, Stiouf I.Y.¹, Uleiskay G.I.², Syasina T.V.¹, Evteeva D.A.¹, Vlasova Y.A.¹,
Malakhova M.Y.¹

BLOOD LIPIDS AND CELLULAR IMMUNITY IN PATIENTS WITH COVID-19, DEPENDING ON THE SEVERITY OF THE DISEASE

¹North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov of the Ministry of Public Health of the Russian Federation, St. Petersburg

²Clinical Hospital N31, St. Petersburg

The results of the dependence of the severity of the condition of patients with COVID-19 on the level of cholesterol and its fractions and various subpopulations of lymphocytes in the blood are presented.

Key words: COVID-19, cholesterol, SARS-COV-2, lymphocyte subpopulations.

В последнее время появилось большое количество исследований, посвященных нарушениям липидного обмена и иммунитета у больных с COVID-19 [2, 4, 6, 11]. Согласно временным методическим рекомендациям по профилактике, диагностике и лечению новой коронавирусной инфекции (COVID-19) (версия 11 от 07.05.2021) МЗ РФ в алгоритмы лабораторного обследования и при дифференциальной диагностике COVID-19 не входит оценка показателей липидного обмена и клеточного иммунитета.

Целью работы было выявить зависимость уровня липидов крови и различных субпопуляций лимфоцитов у пациентов с коронавирусной инфекцией в зависимости от тяжести заболевания.

Материалы и методы

Ретроспективно были изучены истории болезней пациентов с COVID-19 ПЦР+, включая сведения о показателях липидного обмена и иммунной системы, из разных медицинских организаций Санкт-Петербурга. В статистическую обработку были взяты значения общего холестерина (ХС), липопротеидов высокой плотности (ЛПВП), липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) и триглицеридов (ТГ), а также клеточного иммунитета: CD3+, CD4+, CD8+, CD19+, CD16+ и соотношение CD4+/CD8+. Исследования были выполнены сопоставимыми и унифицированными методами. В исследование вошло 63 человека, которые были разделены на 3 группы в зависимости от степени тяжести (1-ая - легкая, 2-ая - средняя и 3-я - тяжелая). Пациенты всех групп были сопоставимы по полу и

возрасту (1-я группа - 59,5±12,8 лет; 2-я группа – 58,3±11,4 года; 3-я группа – 65,4±10,2 года).

Все статистические процедуры выполняли с помощью программного пакета Statistica 10 for Windows (StatSoft, Inc., США). Результаты статистического анализа представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (25 и 75 перцентили). Для расчета достоверных различий между сравниваемыми группами использован непараметрический критерий Краскела-Уоллиса.

Результаты и обсуждение

Показатели липидного обмена у пациентов, инфицированных SARS-COV-2, представлены в таблице 1. Наблюдалась зависимость холестерина и других липопротеидов от тяжести заболевания: резкое падение уровня холестерина у лиц с тяжелым течением COVID-19, несмотря на то, что средний возраст был, сопоставим во всех анализируемых группах.

Таблица 1

Уровни липидов крови у пациентов, инфицированных SARS-COV-2 в зависимости от степени тяжести заболевания (Me, 25; 75 перцентили)

Показатель	Группы		
	1-я группа	2-я группа	3-я группа
Холестерин, ммоль/л	6,0 [5,7; 6,7]	4,05 [3,75; 5,02]*	3,25 [2,92; 3,50]**/***
ЛПВП, ммоль/л	1,31 [1,1; 1,45]	1,21 [0,79; 1,33]	0,72 [0,49; 1,03]**
ЛПНП, ммоль/л	3,39 [3,29; 4,06]	2,85 [2,23; 3,34]	2,0 [1,88; 2,25]**
Триглицериды, Ммоль/л	2,09 [1,34; 2,36]	1,48 [1,32; 1,75]	1,19 [0,81; 1,39]**

Примечание: * - достоверные различия между 1-й и 2-й группами, $p < 0,05$, ** - достоверные различия между 2-й и 3-й группами, $p < 0,05$, ***- достоверные различия между 1-й и 3-й группами, $p < 0,05$.

Снижение уровня липидов крови было пропорционально степени тяжести заболевания COVID-19, достоверные различия были между группой крайне тяжелых лиц и теми, кто легко переносил инфекцию, что согласуется с результатами других исследователей [4, 6, 11].

При анализе показателей клеточного иммунитета у больных, инфицированных SARS-COV-2, не было выявлено достоверных различий между группами. Однако некоторые показатели (Т-лимфоциты, цитотоксические лимфоциты и натуральные киллеры) превышали референтные интервалы в 1,5-3 раза (табл.2).

Таблица 2

Абсолютное количество различных субпопуляций лимфоцитов крови у пациентов, инфицированных SARS-COV-2 в зависимости от степени тяжести заболевания (Ме, 25; 75 перцентили)

Показатель	Группы		
	1-я группа	2-я группа	3-я группа
Т-лимфоциты (CD3+), $\times 10^9/\text{л}$	1,43 [1,26;1,62]	2,29 [1,55;3,76]	3,2 [1,33; 3,8]
Т-хелперы (CD4+), $\times 10^9/\text{л}$	0,91 [0,73;1,10]	1,04 [0,90; 1,22]	1,14 [1,03;1,34]
Цитотоксические лимфоциты, (CD8+), $\times 10^9/\text{л}$	0,41 [0,37; 0,46]	1,04 [0,64; 2,26]	1,87 [0,33; 2,31]
В-лимфоциты (CD19+), $\times 10^9/\text{л}$	0,22 [0,19; 0,26]	0,24 [0,19; 0,32]	0,27 [0,20; 0,39]
Натуральные киллеры (CD16+CD56+), $\times 10^9/\text{л}$	0,25 [0,23; 0,29]	0,45 [0,31; 0,77]	0,98 [0,25; 1,41]
CD3+/CD8+	2,2 [1,8; 2,6]	1,1 [0,6;1,3]	0,76 [0,48; 3,10]

Абсолютное количество Т-лимфоцитов (CD13+) у пациентов с тяжелым течением превышало референтные значения ($1,0-2,41 \times 10^9/\text{л}$) в 1,5-2 раза, цитотоксических лимфоцитов (CD3+CD8+) – в 2-3 раза, натуральных киллеров (CD16+CD56+) – в 3-4 раза по сравнению с референтными интервалами ($0,3-1,0 \times 10^9/\text{л}$ и $0,03-0,5 \times 10^9/\text{л}$, соответственно). Содержание Т-хелперов и В-лимфоцитов находилось в пределах референтных значений, и они не изменялись в зависимости от тяжести заболевания. При оценке соотношения Т-хелперов к цитотоксическим лимфоцитам (CD4+/CD8+) была выявлена обратная зависимость, чем тяжелее течение заболевания, тем ниже соотношение.

Таким образом, при оценке клеточного иммунитета пациентов, инфицированных SARS-COV-2, при тяжелом течении пневмонии установлено повышение абсолютного количества Т-лимфоцитов за счет цитотоксических клеток и натуральных киллеров, что соответствует течению острой вирусной инфекции, а снижение соотношения – о нарушении функционирования иммунной системы и ухудшении прогноза.

У пациентов с COVID-19 наблюдалась выраженная гиполипидемия, снижение уровня ХС и ХС ЛПВП в сыворотке крови и нарушение соотношения различных субпопуляций лимфоцитов в крови, связанные с прогрессированием заболевания и тяжестью симптомов [6]. Известно, что длительное воспаление и инфекция могут вызывать изменения в липидном профиле. При COVID-19 отмечается связь гиполипидемии с тяжестью заболевания [12]. ЛПНП являются потенциальным предиктором неблагоприятного прогноза у пациентов с коронавирусной инфекцией [2]. Снижение концентрации общего холестерина, ЛПВП и

ЛПНП обусловлено тем, что легкие нуждаются в холестерине, так как он включается в состав сурфактанта, синтезируемого альвеолоцитами второго типа [4].

По данным Toelzer C et al. (2020) механизмы внедрения SARS-CoV-2 в клетки касаются ХС, а, возможно, и других липидов (например, линолевой кислоты [11]). Липопротеиды (ЛП) играют важную роль в преодолении вирусами мембраны клетки-хозяина, а нормальный метаболизм ЛП изменяется в результате вирусной агрессии [1]. Под влиянием SARS-CoV-2 липопротеиды становятся модифицированными и выводятся из кровотока через рецепторы в печени. Гепатоцит захватывает модифицированный ЛП путём пиноцитоза. ХС в крови снижается, особенно фракция ЛПВП. Исследования *in vivo* установили важность ХС для облегчения проникновения SARS-CoV-2 в клетку и слияния мембран вирусной оболочки и клетки-хозяина [9].

Исследования крови пациентов с COVID-19 показали, что уровни модификации ЛП соответствуют тяжести инфекции, ЛПНП, ХС ЛПВП, были указаны авторами как липидные биомаркеры, ассоциированные с COVID-19 [6].

ЛПВП также трактуются как молекулы, участвующие в регуляции проникновения вируса SARS-CoV-2 в клетку-хозяина путем эндоцитоза [7]. SARS-CoV-2 «прилипает» к молекулам ХС в ЛПВП, последние связываются со своим клеточным рецептором SR-B1, что помогает расположить патоген так, чтобы спайковый белок мог связаться с рецептором АФП-2, что позволяет ему инфицировать клетки. Более высокий уровень мембранного ХС, как правило, совпадает с более высокой эффективностью проникновения COVID-19 в клетки. У пациентов с COVID-19 наблюдалось снижение уровня холестерина в крови, ЛПВП, и, в меньшей степени, ЛПНП.

Модулированная эффективность проникновения вируса объясняется наличием рецептора SR-B1. Активация липидного обмена, синтез ХС и связывающего белок-2 регуляторного элемента стерола (SREBP-2) коррелируют с цитокиновым штормом, индуцированным коронавирусной инфекцией [10].

При развитии COVID-19 главную роль играет адаптивное состояние иммунной системы. При этом вирус SARS-CoV-2 и Т-клетки конкурируют на платформе липидного обмена. Вместе с жирными кислотами ХС, как эссенциальный компонент клеточных мембран, требуется активированным Т-клеткам. Во время их напряженной работы по борьбе с SARS-CoV-2 происходит метаболическое перепрограммирование Т-лимфоцитов и переключение с глюкозы на потребление липидов как источника энергии. Метаболизм липидов оказывает существенное влияние на Т-клеточную дифференциацию. Активация, дифференциация и пролиферация CD4+ и CD8+ субпопуляций Т-лимфоцитов зависят от ХС

путем либо супрессии LXR β (Liver X receptor beta (LXR- β)), либо активации SREBP2 (фактор транскрипции SREBP-2) [3].

SREBP-2 повышает синтез ХС, активируя PI-3K/Act-mTOR сигнальный путь, который необходим для Т-клеточной активации и дифференциации, а LXR β , напротив, ингибирует накопление ХС, и подавляет функции Т-клеток [5]. При исследовании активации SREBP-2 в мононуклеарах периферической крови у пациентов с COVID-19 верифицировали функцию SREBP-2 [8]. Индуцированный SREBP-2 биосинтез холестерина подавляется экспрессией PCSK9, в то же время индуцированные SREBP-2 воспалительные реакции повышаются у пациентов с COVID-19. В модельных опытах на мышах было показано, что ингибиторы SREBP-2 и NF- κ B подавляли цитокиновые бури, вызванные вирусной инфекцией, и предотвращали повреждение легких, что предполагает использование SREBP-2 как индикатора тяжести заболевания и терапевтической мишени для предотвращения цитокинового шторма и повреждения легких у тяжелых пациентов с COVID-19.

Таким образом, липидный обмен изменяется во время воздействия SARS COV-2, холестерин необходим вирусу для внедрения в клетки-хозяина и Т-лимфоцитам для энергетической поддержки, клеточной активации и дифференциации. Изучение ингибиторов биосинтеза холестерина SREBP-2 и NF- κ B, подавляющих цитокиновые бури, важно для создания лекарственных препаратов против COVID-19.

Заключение

В результате исследования были сделаны выводы: тяжесть течения COVID-19 коррелирует с низкой концентрацией холестерина и его фракций в крови и с высоким содержанием Т-лимфоцитов, натуральных киллеров и цитотоксических лимфоцитов. Эти показатели могут служить для оценки тяжести течения COVID-19, а соотношение Т-хелперов к цитотоксическим лимфоцитам (CD4+/CD8+) - прогноза.

Литература

1. Abu-Farha, M. The Role of Lipid Metabolism in COVID-19 Virus Infection and as a Drug Target /Abu-Farha M., Thanaraj T.A., Qaddoumi M.G., Hashem A., Abubaker J., Al-Mulla F. // Int J Mol Sci. 2020; 21 (10):3544.
2. Fan, J. Letter to the Editor: Low-density lipoprotein is a potential predictor of poor prognosis in patients with coronavirus disease 2019 / Fan J., Wang H., Ye G., Cao X., Xu X., Tan W.//Metabolism. 2020; 107:154243.
3. Fessler M.B., The intracellular cholesterol landscape: dynamic integrator of the immune response // Trends Immunol. 2016. 37(12): 819–30.

4. Gruber M., Prognostic impact of plasma lipids in patients with lower respiratory tract infections - an observational study / Gruber M., Christ-Crain M., Stolz D., Keller U., Müller C., Bingisser R //Swiss Med Wkly. 2009; 139: 166–172.
5. Herold M., Liver X receptor activation promotes differentiation of regulatory T cells/ Herold M., Breuer J., Hucke S.; et al. // PLoS ONE. 2017; 12(9): e0184985.
6. Hu X., Declined serum high density lipoprotein cholesterol is associated with the severity of COVID-19 infection. / Hu X., Chen D., Wu L., He G., Ye W. // Clin Chim Acta. 2020; 510: 105–110.
7. Kočar, E. Cholesterol, lipoproteins, and COVID-19: Basic concepts and clinical applications/ Kočar E., Režen T., Rozman D. // Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids. 2021 Feb; 1866(2): 58849.
8. [Lee](#), W. COVID-19-activated SREBP2 disturbs cholesterol biosynthesis and leads to cytokine storm Signal Transduct Target /Lee W., Hong J.A, Hee Ho Park et al // Ther. 2020 Sep 3; 5(1): 186.
9. Radenkovic, D. Cholesterol in Relation to COVID-19: Should We Care about It? / Radenkovic D., Chawla S., Pirro M., Sahebkar A., Banach M //J Clin Med. 2020; 9: 1909.
10. [Sohrabi](#), Y. Altered Cholesterol and Lipid Synthesis Mediates Hyperinflammation in COVID-19 / Sohrabi Y., Reinecke H., Godfrey R.// Trends Endocrinol Metab. 2021; 32(3):132-134.
11. Toelzer, C. Free fatty acid binding pocket in the locked structure of SARS-CoV-2 spike protein / Toelzer C., Gupta K., Yadav S.K.N., Borucu U., Davidson A.D., Kavanagh Williamson M. // Science. 2020; 370: 725–730
12. Wei, X. Hypolipidemia is associated with the severity of COVID-19 / Wei X., Zeng W., Su J., Wan H., Yu X., Cao X. //J Clin Lipidol., 2020; 14: 297–304.

Сведения об авторах статьи:

Гайковая Лариса Борисовна – д.м.н., доцент, заведующая кафедрой биологической и общей химии им. В.В. Соколовского ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Минздрава Российской Федерации, г. Санкт-Петербург, ул. Кирочная, д. 41, e-mail: largaykovaya@yandex.ru

Стюф Ирина Юрьевна – к.б.н., доцент кафедры клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Санкт-Петербург, ул. Кирочная, д.41 e-mail: stuf.irina@szgmu.ru.

Улейская Галина Ивановна - заведующая лабораторией иммунологии городской клинической больницы № 31, г. Санкт-Петербург, пр. Динамо, д. 3.

Сяпина Татьяна Владимировна - к.м.н., доцент кафедры клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Санкт-Петербург, ул. Кирочная, д.41, e-mail: Tatyana.Syasina@szgmu.ru

Евтеева Дарья Анатольевна – заочный аспирант кафедры биологической и общей химии им. В.В.Соколовского ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Санкт-Петербург, ул. Кирочная, д.41, e-mail: Darya.Evtееva@szgmu.ru

Власова Юлия Александровна – к.б.н., доцент кафедры биологической и общей химии им. В.В.Соколовского ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова»

Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Санкт-Петербург, ул.Кирочная, д.41, e-mail: Yuliya.Vlasova@szgmu.ru

Малахова Маргарита Яковлевна – д.м.н., профессор кафедры клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Санкт-Петербург, ул. Кирочная, д.41, e-mail: Margarita.Malakhova@szgmu.ru

Громенко Ю.Ю.¹, Громенко И.Д.², Галимова Э.Ф.², Галимов Ш.Н.²
О РОЛИ микроРНК В РАЗВИТИИ МУЖСКОГО БЕСПЛОДИЯ*ООО «Медицинский Центр Семья», г.Уфа*²*Башкирский государственный медицинский университет, г.Уфа*

Бесплодие является одной из самых важных медико-социальных проблем современности. Около 10-15% пар в мире страдают от бесплодия. Из них 50% случаев обусловлено мужским фактором. Современные методики обследования часто не позволяют установить причину данного состояния, а также не решают всех проблем диагностики. На сегодняшний день проводятся исследования по поиску новых молекулярных маркеров для обнаружения мужского бесплодия, и идентификации механизмов его развития. Различные исследования показали, что aberrantная экспрессия микроРНК может коррелировать с определенными репродуктивными дисфункциями у мужчин. МикроРНК представляют собой малые некодирующие РНК, регулирующие экспрессию множества генов на посттранскрипционном уровне. В данной статье были рассмотрены последние исследования, опубликованные по вышеизложенному вопросу, чтобы оценить связь между усилением или ослаблением экспрессии различных микроРНК в эякуляте и ролью, которую они играют при мужском бесплодии.

Ключевые слова: микроРНК, бесплодие, мужское бесплодие, биомаркеры.

Y.Y. Gromenko¹, I.D. Gromenko², S.N. Galimov²**"ROLE OF MicroRNAs IN THE DEVELOPMENT OF MALE INFERTILITY "**¹*Department of Biological Chemistry, Ufa*²*Bashkir State Medical University, Ufa*

Infertility is one of the most important medical and social problems of our time. Approximately 10-15% of couples worldwide suffer from infertility. 50% of these cases are caused by a male factor. Modern screening techniques sometime do not identify the cause of this condition, nor do they solve all diagnostic problems. Nowadays, researches are undergoing to find new molecular markers for detecting male infertility, as well as to uncover the mechanisms of this phenomenon. Various studies have shown that aberrant microRNA expression may correlate with certain reproductive dysfunctions in men. MicroRNAs are small noncoding RNAs that regulate the expression of hundreds of genes at the posttranscriptional level. This article reviewed recent studies published on the subject to evaluate the relationship between increased or decreased expression of various microRNAs in the ejaculate and the role they play in male infertility.

Keywords: microRNAs, infertility, male infertility, biomarkers.

Введение. Бесплодие, определяемое как неспособность зачать ребенка после одного года регулярной половой жизни без использования средств и методов контрацепции, является распространенной проблемой репродуктивного здоровья, от которой страдают почти 15% пар во всем мире [2]. На мужское бесплодие приходится 50% случаев бесплодия, которое может быть вызвано врожденными, генетическими или экологическими факторами, однако до 60-75% диагностированного мужского бесплодия, как было установлено, является идиопатическим. Несмотря на обилие информации о различных генах, участвующих в сперматогенезе и созревании сперматозоидов, молекулярная основа мужского бесплодия остается в значительной степени неизвестной. На сегодняшний день существуют исследования, которые показывают, что молекулы некодирующей РНК, известные как микроРНК, могут играть значительную роль в патогенезе мужского бесплодия.

МикроРНК можно обнаружить во всех эукариотических клетках, и было доказано, что они модулируют различные физиологические процессы посредством усиления или ослабления регуляции экспрессии генов [7]. Присутствующие почти во всех тканях и жидкостях организма, многочисленные микроРНК были также выделены в образцах

эякулята, а измененные уровни их экспрессии ассоциируются с отсутствием сперматозоидов (азооспермией), со снижением количества (олигоспермией), низкой подвижностью (астенозооспермией) и аномальной морфологией сперматозоидов (тератозооспермией). Изучение роли коротких микроРНК в оценке мужского бесплодия стало перспективным направлением исследований в области репродуктивной биологии. Последние исследования показывают, что микроРНК регулируют посттранскрипционный сайленсинг генов посредством связывания пар оснований с 3' нетранслируемыми областями (3'-UTR) их целевых мРНК, тем самым играют важную роль в фертильности [8]. На сегодняшний день было проведено множество исследований, чтобы найти микроРНК с разными паттернами экспрессии у бесплодных мужчин в качестве нового многообещающего биомаркера, тем не менее, сохраняется много вопросов о функции микроРНК в сперматозоидах. В данном обзоре рассмотрены основные опубликованные данные о роли микроРНК в развитии мужского бесплодия, в том числе на примере четырех основных категорий аномалий сперматозоидов, включая азооспермию, олигоспермию, астенозооспермию и тератозооспермию.

Биосинтез и механизм действия микроРНК. МикроРНК представляют собой некодирующие РНК, которые состоят из 18-24 нуклеотидов с одноцепочечной структурой и образуются внутри клеток. МикроРНК продуцируются РНК-полимеразой II в ядре в виде шпильки(hairpin), называемой pri-микроРНК. На эту молекулу далее воздействует фермент из группы РНКазы III, называемым Drosha, в результате чего образуется pre-миРНК [1]. Pre-миРНК экспортируется в цитоплазму экспортином-5 и позже подвергается воздействию фермента-Dicer, другого фермента из группы РНКазы III, что приводит к образованию зрелой микроРНК. Зрелая микроРНК принимает участие в формировании РНК-индуцированный комплекса сайленсинга RNA-induced silencing complex (RISC), который подавляет экспрессию генов-мишеней за счет деградации их мРНК или репрессии трансляции (см. рис 1). Одна микроРНК может быть мишенью для нескольких мРНК, и, в свою очередь, одна мРНК может иметь сайты связывания для множества микроРНК [7].

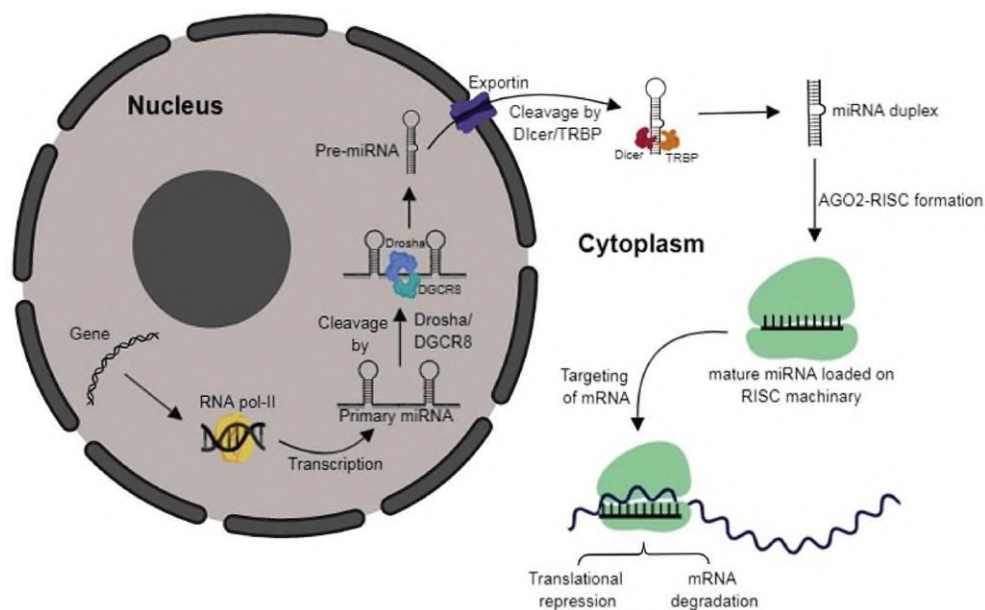


Рис 1. Биосинтез и механизм действия микроРНК

Диагностическая значимость микроРНК. В настоящее время диагностика идиопатического мужского бесплодия ограничивается, в основном, спермограммой, которая включает определение количественных и качественных отклонений [4]. Однако у данного анализа есть ряд ограничений: (1) нормальные результаты спермы не гарантируют зачатие, (2) параметры спермы фертильных и бесплодных мужчин могут совпадать по значительному количеству показателей (3) анализ спермы не раскрывает причины бесплодия. Принимая во внимание упомянутые выше недостатки спермограммы, крайне важно найти новые тесты и биомаркеры для диагностики и характеристики мужского бесплодия.

Новый биомаркер должен быть специфичным, чувствительным, желательно получаемый с помощью неинвазивных методик. МикроРНК циркулируют в различных биологических жидкостях, легко обнаруживаются даже в очень низких концентрациях, появляются гораздо раньше белковых маркеров, что позволяет выявить заболевание на ранней стадии, а экспрессия микроРНК часто является тканевой/биологической стадийно-специфической. МикроРНК более стабильны чем мРНК, так как защищены от эндогенной активности РНК-аз, поскольку существуют в виде комплекса с белком Argonaute [7] или иными механизмами. Таким образом, их относительная стабильность, широкая распространенность, а также высокая специфичность повышает потенциал их использования в качестве биомаркеров.

Изменения экспрессии микроРНК у пациентов с бесплодием. Далее приведены краткие результаты работ посвященных оценке экспрессии микроРНК в эякуляте мужчин страдающих бесплодием, а также оценке роли данных молекул в патогенезе заболевания.

В работе китайских исследователей Wu и др. от 2013 года показано что уровни экспрессии Hsa-miR-141, hsa-miR-429 и hsa-miR-7-1-3p были значительно больше в 100 образцах эякулята с необструктивной азооспермией в сравнении с фертильной контрольной группой [14]. Zhou и др. в 2019 установили, что низкая экспрессия miR-525-3p приводила к азооспермии посредством более высокой экспрессии гена SEMG1 [16]. Египетские исследователи Mostafa и др. 2016 обнаружили, что экспрессия hsa-miR-122, hsa-miR-181a и hsa-miR-34c5 положительно коррелирует с концентрацией, подвижностью и морфологией сперматозоидов [9]. Более того было установлено, что экспрессия hsa-miR-371a-3p в семенной жидкости коррелирует с концентрацией сперматозоидов [10]. Согласно голландскому исследованию 2019 года уровень экспрессии miR-371a-3p коррелировал с концентрацией сперматозоидов [5]. В иранском исследовании 2014 года повышение экспрессии hsa-mir-21 и hsa-mir-22 приводило к развитию олигоспермии и мужскому бесплодию. Механизм данного явления обусловлен низкой экспрессией рецептора эстрогена бета с последующим нарушением капацитации и созревания сперматозоидов [3]. Немецкое исследование пациентов с олигоастеноспермией показало, что экспрессия miR-23a / b-3p имеет обратную связь с подвижностью, морфологией и количеством сперматозоидов [4]. Другое китайское исследование Tian и др. 2017 оценило уровень экспрессии шести микроРНК (hsa-miR-10a, hsa-miR-10b, hsa-miR-135a, hsa-miR-135b, hsa-miR-888 и hsa-miR-891a) у различных групп бесплодных мужчин, включая группу с олигоспермией, азооспермией и астенозооспермией, и сообщило о более низких уровнях экспрессии вышеупомянутых микроРНК во всех опытных группах по сравнению с фертильными мужчинами [11].

Исследование проводимое с целью определения влияния микроРНК на подвижность сперматозоидов установило, что образцы спермы с астенозооспермией показали более низкую экспрессию CRISP2 (богатый цистеином секреторный белок 2) и более высокую экспрессию hsa-miR-27b и указали на регуляторную роль этой пары ген-микроРНК в подвижности сперматозоидов [15]. Исследования семенных микроРНК у пациентов с астенозооспермией показали более высокую экспрессию hsa-miR-151a-5p и более низкую экспрессию hsa-miR-101-3p и let-7b-5p по сравнению с контрольными образцами. Интересное исследование Wang и др. обнаружило, что для 7 микроРНК (hsa-miR-34c-5p, hsa-miR-122, hsa-miR-146b-5p, hsa-miR-181a, hsa-miR-374b, hsa-miR-509-5p и hsa-miR-513a-5p), уровень экспрессии был усилен у пациентов с астенозооспермией, но подавлен у пациентов с азооспермией [13]. В еще одном китайском исследовании Qing и др. 2017 было показано, что экспрессия пяти микроРНК (hsa-miR-891b, hsa-miR-892b, hsa-miR-892a, hsa-miR-888 и hsa-

miR-890) была нарушена у пациентов с астенозооспермией [12]. Иранское исследование оценивавшее экспрессию 18 микроРНК у пациентов с астенозооспермией установило что самые значительные изменения в сторону увеличения претерпевает hsa-miR-888-3p по сравнению с контролем [6].

Заключение

Идиопатическое мужское бесплодие по-прежнему является одной из серьезных проблем, с которыми сталкивается современная медицина на пути совершенствования методов лечения бесплодия. Выяснение ответственных молекулярных изменений при бесплодии имеет огромное значение для поиска новых терапевтических путей и предотвращения длительного и болезненного лечения. МикроРНК рассматриваются как новые биомаркеры, которые могут прояснить неясности, связанные с мужским бесплодием. В последние годы было доказано, что микроРНК влияют на сперматогенез, а их дисрегуляция может стать ключом к разгадке причин возникновения мужского бесплодия. Все больше данных о важной роли микроРНК в регуляции мужской фертильности позволяют предположить, что микроРНК улучшат клиническую диагностику при использовании их в сочетании с традиционными методами. Простота выделения микроРНК из эякулята без использования инвазивных методов и относительно быстрое время постановки диагноза помогут упростить клинический процесс. Для полного использования их потенциала необходимы дополнительные исследования, чтобы выявить типы микроРНК, участвующие в этих процессах, механизм их действия и то, как модуляция их экспрессии может изменить исход для этих пациентов.

Литература

1. Циркулирующие микроРНК как новые потенциальные биомаркеры для ранней диагностики и прогноза спонтанного внутримозгового кровоизлияния у людей / Гареев И.Ф., Сафин Ш.М., Джао Ш., Янг Г. // Медицинский вестник Башкортостана. 2017 -Том 12, № 6 (72)- С. 120-125.
2. World Health Organization WHO. Report of the meeting on the prevention of infertility at the primary health care level. 1983:12–6.
3. Abhari A, Zarghami N, Farzadi L, Nouri M, Shahnazi V. Altered of microRNA expression level in oligospermic patients. Iran J Reprod Med. 2014;12(10):681–6.
4. Abu-Halima M, Ayesh BM, Hart M, Alles J, Fischer U, Hammadeh M, et al. Differential expression of miR-23a/b-3p and its target genes in male patients with subfertility. Fertil Steril. 2019;112(2): 323–35. e 2.

5. Boellaard WPA, Gillis AJM, van Leenders G, Stoop H, van Agthoven T, Dorssers LCJ, et al. Cellular origin of microRNA- 371a-3p in healthy males based on systematic urogenital tract tissue evaluation. *Andrology*. 2019;7(4):463–8.
6. Heidary Z, Zaki-Dizaji M, Saliminejad K, Khorram Khorshid HR. MicroRNA profiling in spermatozoa of men with unexplained as- thenozoospermia. *Andrologia*. 2019;51(6):e13284.
7. Harchegani AB, Shafaghatian H, Tahmasbpour E, Shahriary A. Regulatory functions of microRNAs in male reproductive health: a new approach to understanding male infertility. *Reprod Sci*. 2018 ;1933719118765972.
8. Kotaja N. MicroRNAs and spermatogenesis. *Fertil Steril* 2014; 101:1552–1562.
9. Mostafa T, Rashed LA, Nabil NI, Osman I, Mostafa R, Farag M. Seminal miRNA relationship with apoptotic markers and oxidative stress in infertile men with varicocele. *Biomed Res Int*. 2016;2016: 4302754.
10. Radtke A, Dieckmann KP, Grobelny F, Salzbrunn A, Oing C, Schulze W, et al. Expression of miRNA-371a-3p in seminal plasma and ejaculate is associated with sperm concentration. *Andrology*. 2019;7(4):469–74.
11. Tian H, Lv M, Li Z, Peng D, Tan Y, Wang H, et al. Semen-specific miRNAs: suitable for the distinction of infertile semen in the body fluid identification? *Forensic Sci Int Genet*. 2018;33:161–7.
12. Qing X, Shi J, Dong T, Wu C, Hu L, Li H. Dysregulation of an X- linked primate-specific epididymal microRNA cluster in unex- plained asthenozoospermia. *Oncotarget*. 2017;8(34):56839–49.
13. Wang C, Yang C, Chen X, Yao B, Yang C, Zhu C, et al. Altered profile of seminal plasma microRNAs in the molecular diagnosis of male infertility. *Clin Chem*. 2011;57(12):1722–31.
14. Wu W, Qin Y, Li Z, Dong J, Dai J, Lu C, et al. Genome-wide microRNA expression profiling in idiopathic non-obstructive azo- ospermia: significant up-regulation of miR-141, miR-429 and miR- 7-1-3p. *Hum Reprod*. 2013;28(7):1827–36.
15. Zhou JH, Zhou QZ, Lyu XM, Zhu T, Chen ZJ, Chen MK, et al. The expression of cysteine-rich secretory protein 2 (CRISP2) and its specific regulator miR-27b in the spermatozoa of patients with as- thenozoospermia. *Biol Reprod*. 2015;92(1):28..
16. Zhou QZ, Guo XB, Zhang WS, Zhou JH, Yang C, Bian J, et al. Expressions of miR-525-3p and its target gene SEMG1 in the sper- matozoa of patients with asthenozoospermia. *Andrology*. 2019;7(2):220–7.

Сведения об авторах статьи:

Громенко Юлия Юрьевна - к.м.н., главный врач ООО «Медицинский Центр Семья»
Громенко Иван Дмитриевич - ассистент кафедры биологической химии ФГБОУ ВО БГМУ

Галимова Эльмира Фанисовна - д.м.н., доцент, профессор кафедры патологической физиологии ФГБОУ ВО БГМУ

Галимов Шамиль Нариманович – д.м.н., профессор, зав. кафедрой биологической химии ФГБОУ ВО БГМУ

Карягина Н.Т., Кулагина И.Г., Абдуллина Г.М., Камиллов Ф.Х.

**ИНТЕГРАЦИЯ НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ В ОБЛАСТИ ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ
БИОХИМИИ В ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫЙ ПРОЦЕСС ПО СПЕЦИАЛЬНОСТЯМ 31.05.01
ЛЕЧЕБНОЕ ДЕЛО И 32.05.01 МЕДИКО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЕ ДЕЛО**

Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа

На примере опыта применения научных исследований кафедры биологической химии в области экологической биохимии в преподавании обучающимся по специальностям 31.05.01 Лечебное дело и 32.05.01 Медико-профилактическое дело рассмотрены формы внедрения научных результатов в образовательный процесс и их значимость в подготовке будущих специалистов.

Ключевые слова: научные исследования, экологическая биохимия, образовательный процесс, обучающиеся, медицинские специальности.

Karyagina N.T., Kulagina I.G., Abdullina G.M., Kamilov F.Kh.

**INTEGRATION OF SCIENTIFIC RESEARCH IN THE FIELD OF ENVIRONMENTAL
BIOCHEMISTRY INTO THE EDUCATIONAL PROCESS IN THE SPECIALTIES 31.05.01
GENERAL MEDICINE AND 32.05.01 MEDICAL AND PREVENTIVE CARE**

Bashkir State Medical University, Ufa

On the example of the experience of applying scientific research of the Department of Biological Chemistry in the field of environmental biochemistry in teaching students in the specialties 31.05.01 General medicine and 32.05.01 Medical and preventive care, the forms of introducing scientific results into the educational process and their significance in the training of future specialists are considered.

Key words: scientific research, environmental biochemistry, educational process, students, medical specialties.

Одной из главных задач педагога является поиск путей повышения качества подготовки специалиста. При изучении студентами медицинского вуза дисциплины Биохимия в сознании обучающихся должна формироваться целостная картина о функционировании организма на молекулярном уровне.

По нашему мнению, это возможно при достижении взаимосвязи научных исследований кафедры с процессом обучения.

Среди направлений деятельности кафедры биологической химии Башкирского государственного медицинского университета на протяжении многих лет важное место занимает экологическая биохимия, которая исследует молекулярные механизмы действия различных токсических веществ на организм, изучая их влияние на биохимические показатели систем и органов экспериментальных животных и человека.

Различные аспекты экологии человека вызывают пристальное внимание не только ученых. Рассмотрение их необходимо при подготовке специалистов в медицинских вузах. Это обусловлено тем, что все чаще в медицинской практике встают проблемы экологически значимых и экологически обусловленных болезней. Соответственно, определение роли различных экологических факторов в патогенезе заболеваний является актуальной задачей [5]. Химические загрязнители занимают ведущее место в комплексе антропогенных воздействий на окружающую среду и здоровье населения.

Изучение различных вопросов экологической медицины дает возможность специалистам медицинского профиля осуществлять экологическое образование и

воспитание населения, участвовать в проведении природоохранных мероприятий. Понимание механизмов влияния различных факторов окружающей среды на здоровье человека необходимы врачу для проведения диагностических, лечебных, профилактических и реабилитационных мероприятий. Поэтому в медицинском вузе будущие специалисты должны быть научно ориентированными, с хорошей подготовкой не только по клиническим, но и фундаментальным медицинским дисциплинам, что позволит сформировать у них экологическое мировоззрение. Им необходимо хорошо ориентироваться в вопросах молекулярной медицины, общей и клинической биохимии, иммунологии, аллергологии, прикладной токсикологии [6].

Целью нашей работы является изучение опыта и значения применения результатов научных исследований кафедры биологической химии в области экологической биохимии при подготовке студентов специальностей 31.05.01 Лечебное дело и 32.05.01 Медико-профилактическое дело.

В разные годы проблемой влияния химических веществ, которые производились на заводах химического и нефтехимического комплекса Республики Башкортостан, на здоровье человека занимались сотрудники кафедры. При поддержке Академии наук Республики Башкортостан под руководством Заслуженного деятеля науки Российской Федерации, профессора Ф.Х. Камилова они включились в научно-исследовательскую работу по выявлению молекулярно-биологических механизмов патогенного действия на организм различных экотоксикантов: диоксинсодержащих гербицидов на основе 2, 4 - дихлорфеноксисукусной кислоты (работы Абдуллиной Г.М., Аглетдинова Э.Ф., Галимова Ш.Н., Гильманова А.Ж., Имельбаевой Э.А., Щепанского В.О.), полихлорированных бифенилов (работы Абдуллиной Г.М., Абдуллиной А.З., Аглетдинова Э.Ф., Булыгина К.В., Габдуллиной (Карягиной) Н.Т., Галимова Ш.Н., Галимовой Э.Ф., Макашевой Л.О., Хабилова Р.Э.), дихлорэтана (работы Бикметовой Э.Р., Меньшиковой И.А., Рамазановой Л.М.), медно-цинковой колчеданной руды (работы Газдалиевой Л.М., Галимова Ш.Н., Князевой О.А., Меньшиковой И.А., Саптаровой Л.М.).

Были изучены закономерности развития метаболических, гормональных и иммунохимических нарушений при действии стойких органических загрязнителей, выявлены механизмы их токсического влияния на организм человека и животных на разных уровнях. Так, на кафедре изучались процессы энергетического обмена при действии хлорорганических поллютантов; состояние щитовидной железы и тиреоидзависимый метаболизм при интоксикации хлорированными ароматическими соединениями; влияние на показатели крови ряда экотоксикантов и их иммуотропные эффекты; патохимические

механизмы токсического действия стойких органических загрязнителей на мужскую репродуктивную систему; уровень и активность ферментов монооксигеназной системы с исследованием функционального состояния генов цитохромов P-450 CYP 1A1, CYP 1A2 и цитохрома v_5 в клетках различных органов крыс при острой и подострой интоксикации полихлорированными бифенилами в различных дозах; молекулярные механизмы нарушения метаболизма костной ткани при действии низкомолекулярных хлорорганических соединений и медно-цинковой колчеданной руды. В рамках этих исследований выявлены интенсификация процессов свободно-радикального окисления и изменения активности антиоксидантной защиты, как одного из важных общих патогенетических механизмов токсического действия изученных веществ, вызывающие структурно-функциональные нарушения клеточных мембран, приводящие в свою очередь к изменениям метаболического и функционального статуса клеток, тканей и органов, и функциональных систем [1, 2]. Совместно с сотрудниками кафедры фармакологии исследовалась эффективность коррекции выявленных нарушений различными лекарственными средствами.

В рамках научной деятельности кафедры в области экологической биохимии успешным оказался проект по оценке риска нарушения репродуктивного здоровья мужчин в экологически неблагоприятном регионе, который возглавил профессор Ш.Н. Галимов. Реализация данного проекта вызвала интерес в Республики Башкортостан и за рубежом. Так, работа выполнялась при содействии Республиканского и Уфимского центров планирования семьи и репродукции, а также при финансовой поддержке Агентства США по международному развитию в рамках Соглашения о сотрудничестве с Институтом Устойчивых Сообществ. Реализация проекта позволила получить данные о состоянии гормонального статуса, биохимических показателей состояния спермы у 2000 мужчин 5 промышленных городов Башкортостана; выполнялась также работа на тему «Управление генетическим риском нарушения репродуктивной функции у женщин в промышленном регионе». Были изданы методические указания «Методы оценки репродуктивной функции мужчин» (Ш.Н. Галимов и др.), монография «Гонадотропные эффекты феноксигербицидов в мужском организме» (Ш.Н. Галимов, Ф.Х. Камилов). Заведующий кафедрой профессор Галимов Ш.Н. с проектом «Поиск молекулярных маркеров фертильности при идиопатическом бесплодии у мужчин» в 2018 г. стал победителем конкурса «Эстафета вузовской науки» на Международном медицинском форуме «Вузовская наука. Инновации», в 2019 г. на аналогичном форуме проект «Загрязнение окружающей среды и репродуктивное здоровье: поиск актуальных поллютантов» был удостоен диплома II степени. Совместный проект Башкирского государственного медицинского университета и Национального

медицинского исследовательского центра акушерства, гинекологии и перинатологии «Мужское бесплодие: молекулярные и иммунологические аспекты» (руководитель – проф. Галимов Ш.Н., авторский коллектив – акад. РАН Сухих Г.Т., чл.-корр. РАН Павлов В.Н., д.м.н. Галимова Э.Ф.) получил финансовую поддержку Российского фонда фундаментальных исследований по итогам конкурса 2019 г. на издание лучших научных трудов. Наряду с другими данными авторы монографии приводят доказательства взаимосвязи окружающей среды и нарушений мужской репродуктивной функции, о чем свидетельствует повышенный уровень поллютантов класса полихлорированных дибензопарадиоксинов и фуранов в эякуляте бесплодных мужчин по сравнению с фертильными донорами [4].

В настоящее время на кафедре под руководством профессора Ф.Х. Камилова продолжаются исследования молекулярных механизмов токсического действия химических факторов производственной среды на метаболизм костной ткани в эксперименте и у работников химической промышленности, химически индуцированного остеопороза, разрабатываются методы коррекции патологического состояния и изучается их эффективность. Исследовательский интерес сотрудников привлекает воздействие фактора техногенной среды – медно-цинковой колчеданной руды на организм. Одним из последних аспектов этого воздействия изучалось состояние системы глутатиона в костной ткани при действии компонентов медно-цинковой руды [3].

Научно-педагогическая деятельность связана с обобщением результатов и изданием научных трудов. Результатом многолетних исследований явились монографии «Новые стойкие органические супертоксиканты и их влияние на здоровье человека» (Ш.Н. Галимов и соавторы, 2016), «Профессиональный риск репродуктивных нарушений у работников нефтехимических производств» (Ш.Н. Галимов и соавторы, 2016), «Остеопороз: влияние химических факторов производственной среды на метаболизм костной ткани» (Ф.Х. Камилов, Е.Р. Фаршатова, И.А. Меньшикова, Э.Р. Бикметова, Т.И. Ганеев, 2015).

Разобобщенность данных по ряду специфичных вопросов биохимии, к которым относится и экологическая биохимия, наличие разрозненной информации в многочисленных источниках затрудняет изучение и освоение студентами этого материала. Большой опыт кафедры в научном исследовании этого направления и накопленный багаж теоретических знаний, имеющиеся научные труды сотрудников кафедры позволяют студентам получить глубокие знания и сформировать необходимые компетенции.

Внедрение полученных научных результатов в учебный процесс осуществляется в различных формах. В образовательном процессе используются монографии и научные

статьи, в которых отражены результаты исследований кафедры. При разработке учебно-методических пособий, учебных пособий, учебников, курсов лекций, методических указаний, практикумов, программ курсов и планов семинарских занятий, а также списков рекомендуемой литературы внедряются основные результаты диссертационных исследований.

Разрабатывая рабочие программы дисциплины, мы расширили содержание обучения с учетом необходимости изучения молекулярных механизмов патогенеза токсических поражений организма и детоксикации. Цикл лекций для обучающихся по специальности 31.05.01 Лечебное дело включает лекции на тему «Свободное окисление: микросомальное, пероксисомальное, свободно-радикальное. Антиоксидантная система», «Биохимия печени и биохимические основы детоксикации», а для обучающихся специальности 32.05.01 Медико-профилактическое дело - «Биохимические основы детоксикации. Свободно-радикальное окисление. Антиоксидантные системы». Тематические планы практических занятий предусматривают тему Биохимия печени. Биохимия детоксикации. Свободно-радикальные процессы» для студентов лечебного факультета и тему «Биохимические основы детоксикации. Свободно-радикальное окисление» для студентов специальности 32.05.01 Медико-профилактическое дело.

Важную роль в интеграции и совершенствовании образовательного процесса играет возможность свободного доступа к материалам научных исследований кафедры для обучающихся и организация свободного обмена информацией между преподавателями кафедры, а также других кафедр и других медицинских вузов. Этому традиционно способствовали методические семинары и научные конференции различного уровня. Развитие современных информационных технологий позволило расширить возможности и повысить доступность информации и обмен сведениями за счет создания электронных информационных ресурсов. Все учебно-методические материалы, информация о учебно-методической и научной работе кафедры размещены на сайте и Учебном портале вуза. Преподаватели кафедры принимают активное участие в разработке ресурсов дистанционного обучения.

Исследовательская работа по экологической биохимии представляет большой интерес не только в плане разработки учебно-методических материалов. Студенты могут привлекаться к учебно-методической и научной работе кафедры на различных ее этапах. В ходе выполнения учебных заданий (рефератов, докладов, заданий УИРС) студенты занимаются сбором материала по теме исследования. Преподаватель объясняет особенности работы с различными источниками информации, обучает методике сбора материала.

Обучающийся обрабатывает полученную информацию, сопоставляет и применяет полученные знания и навыки для решения профессиональных задач. Это дает возможность постоянно вводить новые, ранее неизвестные материалы как в учебный процесс, так и использовать их в научной деятельности. Такая методика преподавания заинтересовывает студентов предметом и мотивирует их обучение, поисковую активность, позволяет включать их в процесс создания содержания курсов. Подготовленные студентами научные работы носят в основном информационный характер, но эти сообщения и рефераты обладают несомненной ценностью, т. к. содержат обработанную и обобщенную информацию, и могут содержать ценный, с научной точки зрения, материал. После соответствующей доработки студенты представляют свои научные работы на конференциях различного уровня. Преподаватели кафедры приобщают обучающихся к таким формам научной деятельности, как выступления на научных конференциях студентов и молодых ученых, участие в конкурсах научных работ, публикации в периодической печати.

Таким образом, интеграция научных результатов в текущий учебный процесс играет ведущую роль в формировании профессиональных компетенций выпускников медицинских вузов, а рассмотрение вопросов экологической биохимии с применением научных исследований кафедры способствует более глубокому познанию экологической медицины, что играет важное значение в выявлении причин и конкретных механизмов экологически обусловленных болезней, устранения возникших нарушений, а также профилактической направленности деятельности будущих специалистов медиков.

Литература

1. Гараева Л.Р. Профессиональные группы работников, подвергающихся воздействию репротоксикантов // Вестник Башкирского государственного медицинского университета. – 2017. – № S1. – С. 417-421.
2. Камиллов Ф.Х. Патохимия токсического действия хлорорганических и ароматических соединений // Медицинский вестник Башкортостана. 2007. Т.2. № 6. С. 76-80.
3. Курамшина Г.М., Камиллов Ф.Х. Система глутатиона в костной ткани при действии компонентов медно-цинковой руды и введении антиоксидантов // Казанский медицинский журнал. 2021. Т.102. №.2. С.199-205.
4. Мужское бесплодие: молекулярные и иммунологические аспекты / Ш.Н. Галимов, В.А. Божедомов, Э.Ф. Галимова, В.Н. Павлов, Г.Т. Сухих. Москва: Издательская группа «ГЭОТАР-Медиа», 2020. 208 с.
5. Саломова Ф.И., Садуллаева Х.А. Экология человека в медицинском образовании // Молодой ученый. 2017. № 22 (156). С. 425-427.

6. Эсаулова Т.А., Бучин В.Н., Бучина А.В. Экологическое образование в медицинском вузе // *Фундаментальные исследования*. 2008. № 6. С. 110-111.

Сведения об авторах статьи:

Карягина Наиля Тимерхатмулловна – доцент, кандидат медицинских наук, доцент кафедры биологической химии ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа, ул. Ленина, 3. e-mail: karneltim@yandex.ru

Кулагина Ирина Геннадьевна – доцент, кандидат биологических наук, доцент кафедры биологической химии ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа, ул. Ленина, 3.

Абдуллина Гузель Маратовна – доцент, кандидат биологических наук, доцент кафедры биологической химии ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа, ул. Ленина, 3.

Камилов Феликс Хусайнович – профессор, доктор медицинских наук, профессор кафедры биологической химии ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа, ул. Ленина, 3.

Курамшина Г.Р., Меньшикова И.А., Фаршатова Е.Р., Камиллов Ф.Х.
**АНТИОКСИДЛИТЕЛЬНАЯ СИСТЕМА ПЕЧЕНИ ПРИ ДЕЙСТВИИ СОЛЕЙ
 ТЯЖЁЛЫХ МЕТАЛЛОВ МЕДНО-ЦИНКОВОЙ КОЛЧЕДАННОЙ РУДЫ И
 ВВЕДЕНИИ АНТИОКСИДАНТНОГО ВИТАМИННОГО ПРЕПАРАТА**
Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа

Хроническую интоксикацию крыс вызывали внутрижелудочным введением суспензии порошка медно-колчеданной руды (60 мг/100 г массы). Животные основной группы получали комплекс витаминов с микроэлементом в дозе 50 мг/кг. У животных в ткани печени определяли содержание свободных сульфгидрильных групп, восстановленного глутатиона, аскорбата, α -токоферола, активность глутатионпероксидазы, глутатион-S-трансферазы, каталазы, супероксиддисмутазы и общую антиоксидлительную активность.

Длительное воздействие природного комплекса соединений тяжёлых металлов медно-колчеданной руды в печени приводило к резкому снижению содержания исследуемых компонентов антиоксидлительной защиты, а введение антиоксидантного препарата – комплекса витаминов с селеном сопровождалось повышением уровней восстановленного глутатиона, α -токоферола, аскорбиновой кислоты, активности супероксиддисмутазы, общей антиоксидантной активности и других анализируемых показателей антиоксидантной защиты.

Ключевые слова: медно-колчеданная руда, аскорбат, глутатионпероксидаза, глутатион-S-трансфераза, общая антиоксидлительная активность.

Kuramshina G.R., Menshikova I.A., Farshatova E.R., Kamilov F.X.
**ANTIOXIDANT LIVER SYSTEM AT THE ACTION OF HEAVY METAL SALTS OF
 COPPER-ZINC SQUARE ORE AND ADMINISTRATION
 OF ANTIOXIDANT VITAMIN PREPARATION**
Bashkir state medical University, Ufa

Chronic intoxication of rats was caused by intragastric administration of a suspension of copper-pyrite powder (60 mg/100 g of weight). Animals of the main group received a complex of vitamins with a trace element at a dose of 50 mg/kg. In animals, the content of reduced glutathione, free sulfhydryl groups, ascorbate, α -tocopherol, the activity of glutathione peroxidase, glutathione-S-transferase, superoxidedismutase, catalase, and general antioxidant activity were determined in the liver tissue.

Long-term exposure to the natural complex of heavy metal compounds of copper-pyrite ore in the liver led to a sharp decrease in the content of the studied components of the antioxidant defense, and the introduction of an antioxidant drug - a complex of vitamins with selenium was accompanied by an increase in the levels of reduced glutathione, α -tocopherol, ascorbic acid, superoxidedismutase activity and total antioxidant activity and other analyzed indicators of antioxidant protection.

Key words: copper pyrite ore, ascorbate, glutathione peroxidase, glutathione-S-transferase, general antioxidant activity.

Уральский регион является территорией с развитой горнодобывающей и металлургической промышленностью. Работники горнодобывающих предприятий и население близлежащих территорий подвергаются длительному воздействию комплекса солей тяжёлых металлов, содержащихся в рудах. Так, в медно-цинковых колчеданных рудах Учалинского месторождения (Республика Башкортостан) содержится меди до 3,5%, цинка – 5%, сурьмы – 0,01-0,5%, мышьяка – 0,1-3,0%, свинца – 0,06-0,12%, присутствуют ртуть, кадмий, хром, серебро и др. Ряд тяжелых металлов относятся к биоэлементам, которые в низких концентрациях необходимы для жизнедеятельности, но накапливаясь в тканях, они приводят к метаболическим нарушениям, другие (свинец, кадмий, ртуть, таллий, мышьяк) являются высокотоксичными. Тяжёлые металлы не биоразлагаемы, связываются с тиольными, дисульфидными, тиоэфирными, карбоксильными, фосфатными и другими функциональными группами биомолекул, изменяют их структуру и функциональную

активность, активируют свободнорадикальные процессы, вызывают существенные сдвиги редокс-потенциала, процессов апоптоза и некроза клеток [2,7].

Особое значение токсическое действие солей тяжёлых металлов имеет для рабочих горнообогатительных предприятий, добывающих руду цветных металлов, которые подвергаются их воздействию в силу своей профессиональной деятельности. Помимо профессиональной патологии у них выявляется значительный перечень общих заболеваний сердечно-сосудистой, пищеварительной систем, системы крови и др. [6].

Важную роль в механизмах детоксикации тяжёлых металлов помимо специфических тиолсодержащих белков, играют система глутатиона и другие компоненты антиоксидантной защиты [1].

Целью данной работы является оценка антиокислительной защиты печени при длительном действии компонентов медно-цинковой колчеданной руды и эффективности введения антиоксидантного витаминного препарата.

Материал и методы

Работа выполнена на 30 нелинейных белых крысах-самцах массой 180-240 г. Крысы содержались в идентичных условиях вивария. При проведении экспериментов соблюдались этические нормы и рекомендации по гуманному отношению к лабораторным животным. Эвтаназию животных осуществляли путём декапитации под лёгким эфирным наркозом. Животные были разделены на 3 группы: контрольную, сравнения и основную. Крысам основной группы и группы сравнения в течение 3-х месяцев внутрижелудочно вводили ежедневно суспензию порошка медно-колчеданной руды в объёме 2 мл в 2% растворе крахмала (60 мг/100 г массы), крысы контрольной группы получали только 2% раствор крахмала. Животным основной группы на фоне интоксикации элементами руды в течение третьего месяца эксперимента вводили один раз в сутки суспензию антиоксидантного витаминного препарата внутрижелудочно 1 мл в 2% растворе крахмала (50 мг/кг). Одна капсула комплекса витаминов с микроэлементом содержит: 40 мг α -токоферола, 100 мг аскорбата, 10 мг β -каротина и 50 мкг селена с порошкообразными сухими дрожжами. Суточное количество препарата рассчитывали для крыс с учётом массы и площади поверхности тела.

У животных в ткани печени определяли содержание восстановленного глутатиона (ГВ) по [3], свободных сульфгидрильных групп (ССГ) – по [8], аскорбата – по [12], α -токоферола – по [9], активность глутатионпероксидазы (ГПО) с использованием реагентов «Glutathione Peroxidase» (Randox Laboratories Ltd, Дания), глутатион-S-трансферазы (ГТ) – по [11], супероксиддисмутазы (СОД) – реагенты «Ransod» (Randox Laboratories Ltd, Дания), каталазы

– по [5] и общую антиокислительную активность (ОАА) – по [4]. Содержание белка оценивали по методу Лоури.

Для статистической обработки результатов применяли программу Statistica 6,0 for Windows, рассчитывали медиану (Me) и процентиля (Q_1 и Q_3), оценивали U-критерий Манна-Уитни.

Результаты и обсуждение

При длительном воздействии природного комплекса соединений тяжёлых металлов медно-колчеданной руды в печени наблюдается резкое снижение содержания ГВ и других компонентов антиоксидантной защиты (табл.). Печень является главным органом биосинтеза глутатиона (около 90%), и она является основным органом поддерживающим уровень циркулирующего в крови глутатиона, тогда как остальные органы и ткани утилизируют его путём транспорта через плазматическую мембрану клеток и внутриклеточного ресинтеза в глутаминовом цикле [10]. Одновременно выявляется и уменьшение содержания свободных тиоловых групп белков печени, а также уровень других компонентов антиокислительной защиты – аскорбиновой кислоты и α -токоферола, хотя известно, что аскорбат у крыс синтезируется из L-гулоновой кислоты, образуемой в глюкуронат-ксилоулозном цикле. Биосинтез гулоновой кислоты, катализируется L-гулонат: НАДФ-оксидоредуктазой [КФ 1.1.1.19], требует восстановленной формы НАДФН и, следовательно, конкурирует с процессом редукции окисленного глутатиона.

Таблица

Эффективность применения антиоксидантного витаминного препарата на содержание компонентов антиокислительной защиты в печени при интоксикации компонентами медно-цинковой колчеданной руды, Me [Q_1 - Q_3]

Показатели	Группа животных			p ₁	p ₂	p ₃
	Контрольная n=10	Сравнения, n=8	Основная, n=8			
ГВ, мкмоль/мг белка	13,3 [10,8-16,7]	6,9 [6,3-8,1]	10,9 [9,8-12,8]	0,001	0,037	0,015
ССГ, мкмоль/мг белка	16,6 [16,1-20,0]	12,3 [10,2-16,3]	15,5 [14,6-18,7]	0,029	0,033	0,065
α -токоферол, мкг/мг белка	5,64 [4,76-5,89]	4,7 [4,12-5,55]	5,31 [4,57-5,74]	0,031	0,713	0,073
Аскорбат, мкг/мг белка	13,6 [12,5-14,8]	11,2 [10,4-12,7]	12,6 [10,6-13,8]	0,036	0,094	0,047
ГПО, нмоль/мин*мг белка	7,34 [6,76-10,25]	5,61 [4,77-9,01]	6,91 [6,1-8,37]	0,032	0,544	0,137
ГТ, нмоль/мин*мг белка	146 [136-153]	116 [106-137]	130 [119-147]	0,029	0,049	0,082
СОД, Ед/мг белка	10,9 [8,6-12,0]	7,3 [6,2-8,2]	8,8 [8,1-10,4]	0,027	0,040	0,048
Каталаза, мкмоль/мин*мгбелка	9,5 [8,3-9,9]	7,6 [6,4-8,5]	8,3 [7,7-9,0]	0,055	0,176	0,483

Продолжение таблицы							
ОАА, %		44,2 [38,8-47,9]	32,6 [27,4-37,7]	40,2 [37,5-45,6]	0,024	0,215	0,038

Примечание: p_1 – различия группы сравнения с контролем, p_2 – различия основной группы с контролем, p_3 – различия основной группы с группой сравнения.

Одновременно в печени крыс группы сравнения наблюдается статистически значимое падение активности глутатионпероксидазы, глутатионтрансферазы и супероксиддисмутазы. Снижение активности каталазы не достигает статистической значимости.

В целом при длительной интоксикации комплексом солей тяжёлых металлов медно-цинковой колчеданной руды в печени экспериментальных животных наблюдается истощение компонентов антиоксидантной защиты, что закономерно отражается на общей антиокислительной активности ткани, которая к концу третьего месяца введения суспензии порошка руды составила 73,8% от контрольного уровня ($p=0,024$).

Ежедневное введение в течение третьего месяца эксперимента на фоне интоксикации компонентами медно-цинковой колчеданной руды антиоксидантного препарата – комплекса витаминов с селеном сопровождалось позитивным эффектом. У животных основной группы наблюдалось статистически значимое против группы сравнения повышение уровней восстановленного глутатиона, α -токоферола, аскорбиновой кислоты, активности СОД и общей антиоксидантной активности. Остальные исследуемые показатели антиоксидантной защиты также повышались, но не достигали достоверных различий.

Заключение

Экспериментальное моделирование хронического поступления в организм комплекса солей тяжелых металлов медно-цинковой колчеданной руды в низких дозах вызывает в печени животных существенное снижение компонентов антиокислительной защиты – восстановленного глутатиона, α -токоферола, аскорбиновой кислоты, активности супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы, глутатионтрансферазы. Применение препарата комплекса витаминов с микроэлементом, содержащего α -токоферол, аскорбат, β -каротин, селен на фоне хронической интоксикации элементами, содержащимися в медно-цинковой руде оказывает существенный профилактический эффект.

Литература

1. Борисенок, М.И. Глутатионовый голод клеток: последствия и коррекция / М.И. Борисенок, М.И. Бушма, О.Н. Басалай, А.Ю. Радковец // Медицинские новости. 2019. Т. 302. №11. С.10-15.

2. Камилов, Ф.Х. Минеральная плотность и показатели обмена костной ткани у взрослого населения, проживающего в йододефицитном районе / Ф.Х. Камилов, [и др.] // Медицинский вестник Башкортостана. 2020. Т.15. №1 (85). С. 26-30.
3. Карпищенко, А.И. Глутатион-зависимая антиоксидантная система в некоторых тканях крыс в условиях острого отравления дихлорэтаном / А.И. Карпищенко, С.И. Глушков, В.В. Смирнов // Токсикологический вестник. 1997. №3. С.17-27.
4. Клебанов, Г.И. Оценка антиокислительной активности плазмы крови с применением желточных липопротеинов / Г.И. Клебанов, И.В. Бабенкова, Ю.О. Теселкин [и др.] // Лабораторное дело. 1988. №5. С59-62.
5. Королюк, М.А. Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк, Л.И. Иванова, И.Г. Майорова, В.Е. Токарев // Лабораторное дело. 1988. №1. С.16-19.
6. Каримова, Л.К., Серебряков П.В., Шайхлисламова Э.Р., Яцына И.В. Профессиональные риски нарушения здоровья работников, занятых добычей и переработкой полиметаллических руд / под ред. В.Н. Ракитского, А.Б. Бакирова. М.: Уфа, 2016. 337 с.
7. Токсикологическая химия. Метаболизм и анализ токсикантов / Е.Ю. Афанасьева, Е.Я. Борисова // под ред. проф. Н.И. Калетиной. М.: ГЭОТАР, 2008. 1016 с.
8. Bellomo, G. Modulation of cellular glutathione and protein thiol status during quinone metabolism / G. Bellomo, H. Thor, S. Orrenius // Methods Enzymol. 1990. Vol.186. P. 627-635.
9. Desai, I.D. Vitamin E analysis methods for animal tissues // Methods Enzymol. 1984. Vol.105. P. 138-147.
10. Gabbay, K.H. Ascorbate synthesis pathway. Dial role ascorbate in bone homeostasis / K.H. Gabbay, K.M. Bohren, R. Morello, [et al.] // J. Biol. Chem. 2010. Vol. 285. P.19510-19520.
11. Habig, W.H. Glutation-S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation / W.H. Habig, M.J. Pabst, W.B. Jakoby // J. Biol. Chem. 1974. Vol. 249. № 22. P. 7130-7139/
12. Omaye, S.T. Selectod metods for the determination of ascorbic acid in animal cells, tissues, and fluids / S.T. Omaye, J.D. Turnbull, H.E. Sauberlich // Methods Enzymol. 1979. Vol.62. P. 3-11.

Сведения об авторах статьи:

1. **Курамшина Гульназ Ришатовна** – аспирант кафедры биологической химии ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа, ул. Ленина 3. e-mail: tabletkadg@yandex.ru
2. **Меньшикова Ирина Асхатовна** - кандидат медицинских наук, доцент кафедры биологической химии ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа, ул. Ленина 3. e-mail: i-menshikova@bk.ru
3. **Фаршатова Екатерина Рафаэлевна** - доктор медицинских наук, профессор кафедры патологической физиологии ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа, ул. Ленина 3. e-mail: farshatova-ekaterina@mail.ru
4. **Камилов Феликс Хусаинович** - доктор медицинских наук, профессор кафедры биологической химии ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа, ул. Ленина 3. e-mail: kamilovfx@yandex.ru

Кузьмина О.И., Саптарова Л.М., Галимов Ш.Н.
ПРОТЕОМИКА: ТЕХНОЛОГИИ И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ
Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа

Протеомика включает в себя применение технологий для идентификации и количественного определения общего содержания белков в клетке, ткани или организме. Она дополняет другие «омиксные» технологии такие как геномика и транскриптомика с целью интерпретации роли белков в организме и выяснении роли и функций конкретных белков. Технологии протеомики используются для различных целей, таких как детекция различных диагностических биомаркеров, кандидатов для производства вакцин, понимания функциональных механизмов различных заболеваний, патогенности и изменений профайла экспрессии в ответ на различные сигналы. Протеомика представляет сложность с практической точки зрения, так как она включает и анализ, и категоризацию компонентов протеома. Данный обзор сделан в качестве попытки описать различные подходы, используемые в протеомике, последние разработки и их применение в научных исследованиях и аналитике.

Ключевые слова: протеомика, методы протеомики.

Kuzmina O.I., Saptarova L.M., Galimov Sh.N.
PROTEOMICS: TECHNOLOGIES AND THEIR APPLICATIONS
Bashkir State Medical University, Ufa

Proteomics involves the use of technologies to identify and quantify the total protein content in a cell, tissue or body. It complements other "omix" technologies such as genomics and transcriptomics in order to interpret the role of proteins in the body and clarify the role and functions of specific proteins. Proteomics technologies are used for various purposes, such as the detection of various diagnostic biomarkers, candidates for the production of vaccines, understanding the functional mechanisms of various diseases, pathogenicity and changes in the expression profile in response to various signals. Proteomics is difficult from a practical point of view, since it involves both analysis and categorization of the components of the proteome. This review is made as an attempt to describe the various approaches used in proteomics, the latest developments and their application in scientific research and analytics.

Key words: proteomics, methods of proteomics.

Введение. Динамическая роль молекул, поддерживающих жизнь, была отмечена человеком, начиная с самых ранних биологических исследований. Термин “Протеом” может быть определен как совокупность белков клетки, характеризующейся относительно их локализации, взаимодействий, посттрансляционных модификаций и их обмена, в определенное время. Термин “протеомика” был впервые введен Марком Уилкинсом в 1996, чтобы обозначить “ПРОТЕОМИческое дополнение геноМА» [15]. Большая часть функциональной информации генов характеризуется протеомом, анализ которого представляет собой определенную трудность в связи с огромным разнообразием свойств белков [12]. Технологии протеомики являются одними из наиболее важных подходов, применяемых для понимания функций генов [9]. Белки являются эффекторами биологической функции, их количество в клетке не только зависит от уровней соответствующих мРНК, но также от трансляционного контроля и регуляции. Таким образом, данные, полученные с помощью технологий протеомики, могут считаться наиболее важными для характеристики биологических систем [1]. Наиболее распространенные технологии очистки белков включают в себя ионообменную хроматографию, гель-фильтрацию, аффинную хроматографию [7]. Для анализа отдельных белков могут использоваться твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) и вестерн-блоттинг [10].

Гель-электрофорез (в том числе двумерный) используется для разделения белков в образцах, содержащих их смеси [2]. Микроматричный анализ, в том числе с использованием специальных чипов, является общепринятым методом для анализа картины экспрессии белков в клетке. [16]. Такие методы количественного анализа, как метод изотопных аффинных меток, метод изобарных меток для относительного и абсолютного количественного анализа (iTRAQ) пополнили арсенал протеомики сравнительно недавно [13]. Подходы, основанные на масс-спектрометрии (МС), были разработаны, чтобы анализировать сложные смеси белков с высокой чувствительностью [20]. Для определения трехмерной структуры белков, наиболее часто используют рентгеновскую кристаллографию, ЯМР (ядерно-магнитно-резонансная) спектроскопию и криоэлектронную микроскопию. Анализ протеома с помощью разных методов позволяет получить наиболее полную картину структурной и функциональной информации о клетках.

Ионообменная хроматография. Ионообменная хроматография является универсальным инструментом для очистки белков на основе разделения в зависимости от заряда на поверхности белка. Разделение происходит в первую очередь в зависимости от характера заряда (анион или катион), и во вторую очередь от величины заряда. Данный метод очень распространен как метод очистки белков ввиду его относительной дешевизны и возможности его масштабирования [7].

Гель-фильтрация. Гель-фильтрация разделяет белки, проходящие через пористую матрицу с порами различного размера, на основе их способности проходить через них (согласно молекулярному весу), в различных условиях, в том числе в присутствии детергентов, солей, при различном рН, температуре [17].

Аффинная хроматография. Появление аффинной хроматографии было одним из главных прорывов в методологии очистки белков. Основным принципом лежащим в основе аффинной хроматографии – обратимое взаимодействие между лигандом хроматографической матрицы и белками [4]. Аффинная хроматография имеет широкий спектр применений в идентификации микробных ферментов, вовлеченных в патогенез [3].

Твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA). ELISA является очень чувствительным методом и очень широко используется в целях диагностики. Метод основан на добавлении антител, конъюгированных с ферментом, к антигену или антителам иммобилизованным на твердой поверхности и измерении изменений активности ферментов, которые пропорциональны концентрации антигена в образце [10].

Вестерн-блоттинг. Вестерн-блоттинг является одним из мощных методов для детекции белков, которые находятся в образце в небольших количествах, например

антигенов различных микроорганизмов. Метод включает в себя разделение белков путем гель-электрофореза с переносом на мембрану и детекцию белков с помощью антител, конъюгированных с ферментами [8].

Определение аминокислотной последовательности по Эдману. Метод включает химические реакции, которые удаляют из полипептида с N-конца остаток аминокислоты и идентифицируют его. Метод Эдмана нашел большое применение в разработке биологических лекарственных препаратов, в частности в их контроле качества [14].

Аналитический микроматричный анализ белков. Микроматричный анализ антител является самым распространенным видом микроматричного анализа белков. После захвата антителами белки обнаруживаются прямым мечением белков. Метод, как правило, используется, чтобы измерить уровень экспрессии белков [16].

Функциональный микроматричный анализ белков. Функциональный микроматричный анализ белков основан на применении уже очищенных белков, что позволяет изучать разные взаимодействия белков, в том числе с ДНК, РНК, другими белками, низкомолекулярными лигандами и субстратами [16].

Анализ белков с помощью гель-электрофореза. Одним из часто используемых методов разделения белков согласно их размеру из смесей является электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия [2].

Двухмерный электрофорез в полиакриламидном геле. Двухмерный электрофорез в полиакриламидном геле является эффективным и надежным методом для разделения белков на основе их массы и заряда. Как правило, сначала белки разделяются согласно их заряду в первом измерении, а затем во втором измерении - согласно различиям между их массой. Двухмерный электрофорез успешно применяется для характеристики посттрансляционных модификаций, поиска мутантных форм белков и оценки метаболических путей [6].

Двухмерный дифференциальный электрофорез в полиакриламидном геле. Данный метод использует белки, меченные краской, которая может быть легко визуализирована после возбуждения волнами специфической длины [11].

Метод изотопных аффинных меток (англ. isotope coded affinity tag, ICAT). ICAT является методом, в котором химические метки используются для количественного анализа белков. Данный метод значительно расширил ассортимент белков, которые можно количественно проанализировать, и позволил выполнять точное определение количества и идентификацию белков из сложных смесей [13]. ICAT часто применяется в сочетании с методом ЖХ-МС/МС.

Метод изобарных меток для относительного и абсолютного количественного

анализа (англ. isobaric tag for relative and absolute quantitation, iTRAQ). iTRAQ является мультиплексным методом мечения белка для количественного анализа на основе тандемной МС. Этот метод основан на мечении белка с помощью изобарических меток для относительной и абсолютной количественной оценки. Данный метод позволяет одновременно идентифицировать и количественно охарактеризовать белки [18].

Рентгеновская кристаллография. Рентгеновская кристаллография является самым предпочтительным методом для определения трехмерной структуры белков и их комплексов. Белки кристаллизуют и затем кристаллы подвергают воздействию пучка рентгеновских лучей, в результате чего получают картину дифракции лучей на кристалле, на основе которой получают модель. Метод предоставляет важную информацию, которую можно применять в изучении ферментных механизмов, разработке лекарственных средств, сайт-направленном мутагенезе, изучении взаимодействий белок-лиганд [15].

Масс-спектрометрия (МС). МС используется, чтобы измерить показатель отношения массы к заряду (m/z), что позволяет определить молекулярную массу белков. Обычно используемые методы ионизации включают матричную лазерную десорбционную ионизацию (MALDI), лазерную десорбцию/ионизацию на улучшенной поверхности (SELDI) и ионизацию электроспреем (ESI) [20]. МС нашла широкое применение в протеомике, в том числе и в сочетании с жидкостной хроматографией (метод ЖХ-МС/МС).

ЯМР спектроскопия. ЯМР является ведущим инструментом для определения структуры белков, их сворачивания и поведения в растворе. Преимуществом данного метода является возможность получения трехмерной структуры в растворе, приближенной к нативному состоянию в клетке. Данные, полученные методом ЯМР, часто находят применение в дизайне молекул при разработке лекарственных препаратов, гомологичном моделировании и функциональной геномике [18]. ЯМР может применяться вместе с различными подходами как ЖХ или высокоэффективная ЖХ (ВЭЖХ), чтобы увеличить разрешение и чувствительность для профайлинга белков.

Крио-электронная микроскопия. В последнее время также для получения информации о трехмерной структуре белковых комплексов, а также отдельных крупноразмерных белков применяется данный метод, так как благодаря последним достижениям удалось разработать подходы, позволяющие получать структуры с атомарным разрешением. Кроме того, была продемонстрирована возможность идентификации белков в сложных смесях, таких как клеточные экстракты [5].

Заключение

В последние годы были достигнуты значительные успехи в области протеомики.

Методы стали быстрыми, чувствительными и позволяющими получить большую информацию о протеоме. Более того, сочетание различных подходов позволило добиться успеха в очистке, анализе, количественном определении, секвенировании и структурном анализе большого количества белков из различных видов живых организмов. Следует отметить, что развитие протеомики играет важное значение для развития диагностики и разработки лекарств.

Литература

1. Cox, J., Mann, M.; Is proteomics the new genomics? *Cell*, (2007); 130 (3): 395–398.
2. Dunn, M.J.; *Gel Electrophoresis of Proteins*. Elsevier BV, Oxford, UK, (1986).
3. Grice, S.F.J., Gruninger-Leitch, F.; Rapid purification of homodimer and heterodimer HIV-1 reverse transcriptase by metal chelate affinity chromatography; *European Journal of Biochemistry/FEBS*, (1990); 187(2): 307–314.
4. Hage, D.S., Anguizola, J.A., Bi, C. et al. Pharmaceutical and biomedical applications of affinity chromatography: Recent trends and developments; *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (2012); 69: 93–105.
5. Ho C., Li X., Lai M. et al. Bottom-up structural proteomics: cryoEM of protein complexes enriched from the cellular milieu. *Nat Methods*. 2020 Jan;17(1):79-85.
6. Issaq, H., Veenstra, T.; Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE): advances and perspectives; *BioTechniques*, (2008); 44 (Supplement (4)): 697–700.
7. Jungbauer, A., Hahn, R.; Ion-exchange chromatography. In *Methods in Enzymology*. Elsevier BV, Massachusetts, USA, (2009), pp. 349–371.
8. Kurien, B., Scofield, R.; Western blotting; *Methods (San Diego, CA)*, (2006); 38(4):283–293.
9. Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B. et al. Initial sequencing and analysis of the human genome; *Nature*, (2001); 409(6822): 860–921.
10. Lequin, R.M.; Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA); *Clinical Chemistry*, (2005); 51(12): 2415–2418.
11. Marouga, R., David, S., Hawkins, E.; The development of the DIGE system; *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, (2005); 382(3): 669–678.
12. Pandey, A., Mann, M.; Proteomics to study genes and genomes; *Nature*, (2000); 405(6788): 837–846.
13. Shiio, Y., Aebersold, R.; Quantitative proteome analysis using isotope-coded affinity tags and mass spectrometry; *Nature Protocols*, (2006); 1(1): 139–145.
14. Smith, J.B.; Peptide sequencing by Edman degradation. In *Encyclopedia of Life Sciences*. Wiley-Blackwell, Hoboken, NJ, USA, (2001).

15. Smyth, M.S., Martin, J.H.; X ray crystallography; *Molecular Pathology*: (2000); 53(1): 8–14.
16. Sutandy, F.X.R., Qian, J., Chen, C.-S., Zhu, H.; Overview of Protein Microarrays. *Current Protocols in Protein Science*. Wiley-Blackwell, (2001).
17. Voedisch, B., Thie, H.; Size exclusion chromatography. In *Antibody Engineering*. Springer, Berlin, Heidelberg, (2010), pp. 607–612.
18. Wiese, S., Reidegeld, K.A., Meyer, H.E. et al. Protein labeling by iTRAQ: A new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research; *Proteomics*, (2007); 7(3): 340–350.
19. Wilkins, M.R., Sanchez, J.-C., Gooley, A.A. et al. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it; *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, (1996); 13(1): 19–50. 2.
20. Yates Iii, J.R.; A century of mass spectrometry: from atoms to proteomes; *Nature Methods*, (2011); 8(8): 633–637.

Сведения об авторах статьи:

Кузьмина Ольга Ильинична – кандидат биологических наук, доцент кафедры биохимии, Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа, ул. Ленина 3.
e-mail: olya.kuzmina.ibg@gmail.ru

Спатарова Лилиана Минкаировна – кандидат биологических наук, доцент кафедры биохимии, Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа, ул. Ленина 3.
e-mail: saptarovaLiliana@yandex.ru

Галимов Шамиль Нариманович – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой биохимии, Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа, ул. Ленина 3. e-mail: sgalim@hotmail.ru

Марсянова Ю.А., Звягина В.И.

ИЗМЕНЕНИЕ НЕКОТОРЫХ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ МИТОХОНДРИЙ ПРИ АДАПТАЦИИ К ГИПОКСИИ

ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика
И.П. Павлова», г. Рязань

Гипоксия является фактором развития широкого спектра нарушений, в том числе вторичных митохондриальных дисфункций. Хронический дефицит кислорода приводит к изменению активности ферментов электрон-транспортной цепи и антиоксидантной защиты митохондрий, а так же к развитию окислительного стресса в разной степени в зависимости от функций тканей.

Ключевые слова: митохондрии, гипоксия, эпидидимис.

Marsyanova Y.A., Zvyagina V.I.

CHANGES IN SOME BIOCHEMICAL PARAMETERS OF MITOCHONDRIA DURING ADAPTATION TO HYPOXIA

Ryazan State Medical University named after academician I.P. Pavlov

Hypoxia is a factor in the development of a wide range of disorders, including secondary mitochondrial dysfunctions. Chronic oxygen deficiency leads to a change in the activity of enzymes of the electron transport chain and antioxidant protection of mitochondria, as well as to the development of oxidative stress to varying degrees depending on tissue functions.

Keywords: mitochondria, hypoxia, epididymis.

Введение. Одной из самых обсуждаемых тем в научном мире является изучение адаптации организма к изменениям уровня кислорода в окружающей среде. Изучаются молекулярные механизмы влияния объёма кислорода на метаболизм клетки. Адаптация к гипоксии имеет важное значение для организма человека, например, такие физиологические процессы, как физическая работа, рост плаценты и развитие плода, регулируются за счёт механизмов адаптации к пониженному содержанию кислорода. Однако понимание молекулярных механизмов влияния гипоксии и нарушений, возникающих при этом, приобретает особую значимость при изучении патологических состояний и способов их коррекции. Например, расстройства кровообращения в малом тазу могут служить причиной развития мужского бесплодия [1], антенатальная гипоксия является одним из факторов развития болезни Альцгеймера [2]. Поэтому изучение влияния кислорода и молекулярных механизмов адаптации к гипоксии остаётся актуальным, несмотря на большой объём накопленных данных.

Проблема с жизнеспособностью сперматозоидов может быть скрыта в нарушении работы митохондрий, так называемых вторичных митохондриальных дисфункциях. Часто, такие нарушения трудно определяются, что затрудняет постановку диагноза и назначение лечения [3]. Очевидно, что в условиях дефицита кислорода первой мишенью с одной стороны и начальным звеном патогенеза с другой становятся митохондрии. Нарушение работы цепи переноса электронов становится причиной быстрого накопления активных форм кислорода, что сопровождается сильнейшим окислительным стрессом, известно, что окислительный стресс негативно влияет на показатели эякулята [4]. Поэтому, для решения

проблем мужского репродуктивного здоровья необходимо глубокое изучение обсуждаемых механизмов.

Цель данной работы заключается в оценке изменений функций митохондрий и выявления возможного развития вторичных митохондриальных дисфункций в условиях хронической нормобарической гипоксии.

Материалы и методы исследования

Эксперимент выполнен на 16 половозрелых самцах крыс сток Wistar массой тела 200-280 г, которые содержались в стандартных условиях вивария на базе РязГМУ им. И.П. Павлова. Работа с животными осуществлялась в соответствии с «Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986), Приказом МЗ РФ от 1 апреля 2016 г. № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики» и Приказом МЗ СССР от 12.08.1977 г. № 755 «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных». Животные были разделены на две группы. Группа 1 – животные, подвергшиеся воздействию хронической нормобарической гипоксии по методике острой нормобарической гипоксической гипоксии с гиперкапнией у мышей (М.В. Кораблев и П.И. Лукиенко (1976) [5] в нашей модификации [6]. Животных помещали в герметичную камеру (размер Д×Ш×В: 10,5×10,5×11 см), объемом 1,2 л, подключенную к многоканальному газоанализатору МАГ-6-П-К (O₂, интервал измерения 0-100%), до тех пор, пока уровень кислорода в камере с животным не снижался до 10% [7]. Сеансы повторяли ежедневно, в течение 14 дней. Группа 2 – животные, которые повторяли условия эксперимента, аналогичной группе 1, но помещались в вентилируемую камеру.

В последний день эксперимента сразу после окончания процедур крысам вводили наркоз (смесь «Золетил 100» и «Ксиланит» в дозировке 6 мг/кг массы тела животного одноразовым инсулиновым шприцем внутримышечно). Далее отбирали семенные пузырьки и эпидидимис, из которых получали гомогенаты с помощью гомогенизатора Potter S (Sartorius AG, Германия) в Трис-НСl буфере рН=7.4, содержащем 0,25 М раствор сахарозы, в соотношении 1 часть ткани к 9 частям буфера. Все процедуры проводили при температуре не выше 4°C. Полученные гомогенаты центрифугировали дважды: по 15 минут при 3000 g для осаждения ядер и неразрушенных клеток, и при 14000 g для осаждения митохондрий. Осадок ресуспензировали в среде выделения и использовали в качестве материала для исследования.

Определяли активность цитохромоксидазы, в у.е./мг белка, кинетическим методом по скорости изменения оптической плотности раствора цитохрома с; АТФ-синтазы, в мкмоль фосфата/(мг белка•час), – по скорости гидролиза АТФ; супероксиддисмутазы (СОД), в у.е./мг

белка, где за одну условную единицу принимали величину % ингибирования скорости реакции аутоокисления кверцетина в присутствии материала за 1 минуту, сукцинатдегидрогеназы (СДГ), в нмоль сукцината/(мг белка•мин), – по скорости восстановления феррицианида калия; лактатдегидрогеназы (ЛДГ), в у.е./мг белка, – с помощью набора «ЛДГ-2-ОЛЬВЕКС» (Ольвекс Диагностикум, РФ). Содержание молочной кислоты, в мкмоль/мг белка, определяли с помощью набора «МОЛОЧНАЯ КИСЛОТА-ОЛЬВЕКС» (Ольвекс Диагностикум, РФ); сукцината, в мкмоль/мг белка, – с помощью набора «Succinate Colorimetric Assay Kit» (Sigma-Aldrich Co, США); продуктов окислительной модификации белков, в у.е./мг белка, оценивали путём подсчёта площади под кривой спектра поглощения ДНФГ-дериватов карбонильных производных белков. В каждой пробе определяли концентрацию общего белка по методу Лоури с помощью набора «КлиниТест-БЛ» (ЭКО Сервис, РФ). Статистическую обработку данных проводили с помощью программ «MicrosoftExcel2013» и StatSoft STATISTICA 12. Нормальность распределения определяли с помощью критерия Шапиро-Уилка. Для оценки уровня значимости в группах, где выборка данных подчинялась нормальному закону распределения, использовали параметрический t-критерий Стьюдента, если распределение не соответствовало нормальному хотя бы в одной из групп сравнения – непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Уровень различий считали статистически значимым при вероятности ошибки $p < 0,05$. При значении $0,05 \leq p < 0,10$ считали вероятной тенденцию к изменению показателей.

Результаты

Дефицит кислорода в моделируемых условиях привёл к снижению активности цитохромоксидазы в обоих функциональных участках придатка яичка (табл.), но не повлиял на активность АТФ-синтазы и сукцинатдегидрогеназы. Возможно, что такие изменения позволяют клетке эффективнее использовать имеющиеся ресурсы во время пребывания в состоянии гипоксии.

Таблица

Результаты лабораторного исследования, Ме [Q1; Q3]

Показатель	Головка эпидидимиса		Хвост эпидидимиса	
	Группа 1	Группа 2	Группа 1	Группа 2
ЦО	0,34 [0,26; 0,49]; p=0,01	0,89 [0,64; 1,05]	0,54 [0,36; 0,64]; p=0,032	1,23 [0,91; 2,21]
АТФ-синтаза	14 [12,1; 17,5]; p=0,1	7,9 [5,9; 14,6]	8,9 [6,9; 14,3]; p=0,7	8,1 [2,6; 14,2]
ЛДГ	804 [709; 977]; p=0,001	3383 [1659; 4088]	2882 [2394; 3529]; p=0,4	2732 [1592; 3140]
Лактат	2,64 [2,23; 3,03]; p=0,0009	5,65 [4,38; 7,47]	4,38 [2,75; 6,55]; p=0,5	6,25 [4,84; 8,12]

Продолжение таблицы				
СДГ	0,4 [0,28; 0,67]; p=0,49	0,35 [0,1; 0,52]	0,26 [0,19; 0,63]; p=0,9	0,22 [0,18; 0,67]
Сукцинат	838 [660; 928]; p=0,004	1202 [1092; 1868]	958 [760; 1078]; p=0,03	1355 [1240; 1608]
СОД	8,18 [5,57; 11,15]; p=0,00001	36,82 [34,15; 44,34]	8,64 [6,15; 13,69]; p=0,018	37,84 [17,63; 40,98]
ОМБ	319,1 [241; 363,6]; p=0,0009	17,9 [15,3; 27,6]	41,3 [36,4; 43,6]; p=0,1	16,8 [7,9; 41,2]

Однако по другим показателям головка и хвост эпидидимиса отреагировали по-разному. Так, активность лактатдегидрогеназы существенно снизилась в первом случае, но не изменилась во втором, как и количество молочной кислоты. Это можно объяснить с точки зрения функций этих тканей, так как в головке происходит интенсивное созревание сперматозоидов и все процессы протекают активнее, в то время как в хвосте они накапливаются и при сниженном темпе метаболизма адаптация к гипоксии оказывается менее необходимой. В пользу этой теории свидетельствует возрастание окислительной модификации белков в головке эпидидимиса в отличие от хвоста притом, что активность супероксиддисмутазы, как одного из важнейших ферментов антиоксидантной системы, снижается в обоих функциональных участках придатка яичка.

Несмотря на то, что активность сукцинатдегидрогеназы не изменилась, количество сукцината оказалось сниженным в группе животных, испытывающих гипоксию, что ещё раз подтверждает активацию сукцинатоксидазного пути получения энергии при дефиците кислорода.

Низкая активность лактатдегидрогеназы и малое количество молочной кислоты в головке придатка яичка можно трактовать так, что превращение пирувата в лактат в исследуемых условиях заторможено, что приводит к накоплению второго продукта этой реакции – восстановленного НАД. Последний, вероятно, стимулирует работу дыхательной цепи, что при сниженной активности цитохромоксидазы приводит к формированию большого количества активных форм кислорода. А это уже послужило увеличению окислительного повреждения белков.

Выводы

Хроническая гипоксия привела к снижению активности цитохромоксидазы в тканях придатка яичка. Наиболее уязвимым участком оказалась головка эпидидимиса, где сильно выражено накопление продуктов окислительной модификации белков. При дефиците кислорода увеличилось использование сукцината в качестве энергетического субстрата.

Литература

1. Жайтлеуов Г.Х. Варикоцеле, как одна из причин мужского бесплодия // Вестник хирургии Казахстана. 2011. №2 (26)
2. Shen G, Hu S, Zhao Z, Zhang L, Ma Q. Antenatal Hypoxia Accelerates the Onset of Alzheimer's Disease Pathology in 5xFAD Mouse Model. *Front Aging Neurosci.* 2020 Aug 21;12:251. doi: 10.3389/fnagi.2020.00251. PMID: 32973487; PMCID: PMC7472639.
3. Hannah R. Elliott, David C. Samuels, James A. Eden, Caroline L. Relton, Patrick F. Chinnery Pathogenic Mitochondrial DNA Mutations Are Common in the General Population // *The American Journal of Human Genetics.* Volume 83. Issue 2. August 08. 2008. P. 254-260.
4. Галимова С.Ш., Гайсина А.Ф., Травников О.Ю., Галимова Э.Ф. Диоксины и окислительно-восстановительный статус эякулята: есть ли связь с фертильностью? // *Наука молодых – Eruditio Juvenium.* 2018. №2. С. 259-266.
5. Стасюк О.Н., Альфонсова Е.В., Авсеенко Н.Д. Экспериментальное исследование влияния дефицита кислорода на кислотно-основное состояние // *Современные проблемы науки и образования.* 2016; 6:130-137.
6. Патент 2739675. Российская Федерация, МПК G09В 23/28. Способ моделирования нормобарической хронической гипоксии: № 2020123722: заявл. 17.07.2020: опубл. 28.12.2020 / Ю.А. Марсянова, В.И. Звягина
7. Ball МК, Waура GB, Mungai PT, et al. Regulation of hypoxia-induced pulmonary hypertension by vascular smooth muscle hypoxia-inducible factor-1 α . *Am J RespirCrit Care Med.* 2014;189(3):314–324. <https://doi.org/10.1164/rccm.201302-0302OC>

Сведения об авторах статьи:

Марсянова Юлия Александровна - ассистент кафедры биологической химии с курсом КЛД ФДПО ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России. e-mail: yuliyamarsyanova@yahoo.com.

Звягина Валентина Ивановна - доцент, к.б.н., доцент кафедры биологической химии с курсом КЛД ФДПО ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России.

Меньшикова И.А., Бикметова Э.Р., Камиллов Ф.Х., Галимов Ш.Н.
**ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИНГИБИТОРА СКЛЕРОСТИНА ДЛЯ
КОРРЕКЦИИ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ В КОСТНОЙ ТКАНИ У
ПАЦИЕНТОВ С ОСТЕОПОРОЗОМ**

Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа

После открытия склеростина - одного из ключевых ингибиторов образования кости, стали разрабатываться новые концепции по снижению активности этого белка и усилению костеобразования. Ингибирование склеростина с помощью моноклональных антител – ромосозумабамом - улучшает структуру кости и повышает костную прочность.

Ключевые слова: остеопороз, склеростин, ромосозумаб.

Menshikova I.A., Bikmetova E.R., Kamilov F.X., Galimov Sh.N.
**THE POSSIBILITY OF USING A SCLEROSTIN INHIBITOR FOR THE CORRECTION
OF METABOLIC DISORDERS IN BONE TISSUE IN PATIENTS WITH OSTEOPOROSIS**
Bashkir state medical University, Ufa

After the discovery of sclerostin, one of the key inhibitors of bone formation, new concepts began to be developed to reduce the activity of this protein and enhance bone formation. Inhibition of sclerostin using monoclonal antibodies – romosozumab - improves bone structure and increases bone strength.

Key words: osteoporosis, sclerostin, romosozumab.

На сегодняшний день одним из распространенных заболеваний с низкой костной массой является остеопороз (ОП). Предикторами развития и клинического течения ОП являются многочисленные факторы: возраст, низкий/высокий индекс массы тела, менопауза, сопутствующие заболевания, приём глюкокортикоидов, воздействие химических факторов и др. [4,5,8,9]. Эти риск-факторы нарушают баланс ремоделирования кости, усиливая остеокластопосредованную резорбцию и подавляя остеобластопосредованное формирование и минерализацию костной ткани, приводя к потере её массы [5,6,8].

В терапии ОП широко используется группа антирезорбтивных препаратов (бисфосфонаты, кальцитонин, эстрогены, селективные модуляторы эстрогеновых рецепторов, деносумаб и др.), реже – анаболических. Изучение и открытие молекул, регулирующих костный метаболизм, например, склеростина [3,7,12], привело к созданию новых костеобразующих препаратов.

Цель работы

Изучить роль ингибитора склеростина (ромосозумаба) в лечении остеопороза.

Материал и методы

В статье представлен анализ литературного обзора, данные доклинических и клинических исследований нового препарата ромосозумаба [7,10,15,18,20,22].

Результаты и обсуждение

В современных научных публикациях описана ведущая роль Wnt/ β -катенин-сигнального пути (Wnt) в формировании костной ткани [1,2,12,13].

Склеростин (SOST) – это гликопротеин, экспрессируемый в остеоцитах. При его связывании с рецепторами LRP₅/LRP₆ нарушается активация Wnt в кости, снижается костеобразование [1,2,3,12,16,17]. Действие SOST приводит также к повышению экспрессии RANK на клеточной мембране преостеокластов, снижению концентрации остеопротегерина, и, как следствие, усилению резорбции кости.

Учитывая механизм действия SOST, были разработаны препараты, которые блокируют образование остецит-продуцированного склеростина. Ингибирование синтеза SOST помогает связаться Wnt с рецепторным комплексом LRP₅/LRP₆, усиливая Wnt/ β -катенин сигнальный путь в остеобластах, что приводит к повышению их остеосинтетической активности и костеобразованию [7,14].

Среди препаратов, способных связываться и ингибировать SOST, нами был изучен ромосозумаб (компания Amgen), представляющий собой гуманизированное моноклональное антитело (IgG₂).

Доклинические испытания ромосозумаба на животных (грызуны, приматы) показали положительное влияние на ремоделирование костной ткани. 3-х месячная терапия приводила к повышению маркёров костеобразования, таких как остеокальцин, костная щелочная фосфатаза (КЩФ) и N-терминальный пропептид проколлагена I типа (P₁NP), улучшались показатели формирования кости на костной гистоморфометрии [7,20].

В таблице представлены данные протоколов клинических исследований ромосозумаба.

У пациентов, включенных в Ia фазу клинических исследований, через 2 месяца терапии ромосозумабом было выявлено повышение уровня маркёров формирования кости, а через 3 месяца - отмечали рост МПК в позвонках и бедре, на 5% и 1%, соответственно [10,13,18].

В Ib фазе клинических исследований на снимках компьютерной томографии поясничных позвонков (L₁–L₂) через 3 месяца лечения наблюдали повышение минеральной плотности губчатого вещества на 9,5% и кортикального слоя кости на 27% (группа плацебо 3% и 2,7%, соответственно) [11,19,21].

Во IIa фазу клинических исследований были определены оптимальный режим терапии и безопасная доза ромосозумаба - 210 мг 1 раз в месяц, при которой в сыворотке крови быстро повышались P₁NP и КЩФ - маркёры образования кости при значительном уменьшении маркёра деградации – C-концевого телопептида коллагена I типа (СТх). Прирост МПК на 5% сохранялся до 12-14 месяцев [11,19,21].

Таблица

Данные включения пациентов в клинические испытания и использования протоколов лечения ромосозумабом

Фаза клинического исследования/ Группы пациентов		Режим лечения ромосозумабом	Показатели Т-критерия
Ia	32 женщины в постменопаузе и 16 мужчин, возраст 45-80 лет	3 мес., подкожно (1-2 мг/кг 1 раз в 2 недели или 2-3 мг/кг каждые 4 недели)	До -1,0SD
Ib (рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое)	32 женщины в постменопаузе и 16 мужчин, возраст 45-80 лет	3 мес., подкожно (1-3 мг/кг каждые 2 недели)	От -2,5SD до -1,0SD
IIa (плацебо-контролируемая)	420 женщин в постменопаузе, возраст 55-85 лет	Подкожно с интервалом 1 или 3 мес., 70 мг, 140 мг и 210 мг. Контрольная группа - алендроновая к-та 70 мг/нед и терипаратид 20мкг/сут	< -2,5SD
IIb		Подкожно в течение 12 мес. (210 мг 1 раз в месяц). Следующий год – плацебо.	< -2,5SD
III (международное рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование)	Более 7000 женщин с постменопаузальны м ОП	Подкожно в течение 12 мес. (210 мг 1 раз в месяц). Следующий год – деносумабом 60 мг/мес.	< -2,5SD

У пациенток IIb фазы клинических исследований, наблюдающихся в течение 2 лет, после завершения терапии ромосозумабом выявили снижение уровня P₁NP и увеличение концентрации СТх. Показатели МПК вернулись к исходному значению после прекращения лечения и ромосозумабом, и деносумабом [13,21]. Следовательно, после отмены ромосозумаба для увеличения МПК необходимо продолжить лечение ОП антирезорбтивными препаратами. Также исследования показали, что ромосозумаб снижает риск переломов позвонков и бедра, в среднем на 70% [15,19,21,22].

Заключение

В будущем, для характеристики состояния костной ткани, к перечню маркёров ремоделирования кости, можно добавить определение уровня склеростина.

Ромосозумаб – это представитель нового класса антиостеопоротических препаратов, который доказал свою эффективность в проведенных исследованиях. Уникальность терапии ромосозумабабом демонстрирует не только рост МПК, но и снижение риска позвоночных/внепозвоночных переломов, и может быть рекомендована для женщин в постменопаузе с тяжелым остеопорозом и высоким риском переломов.

Литература

1. Гребенникова, Т.А. Канонический сигнальный путь Wnt/ β -катенин: от истории открытия до клинического применения / Т.А. Гребенникова, Ж.Е. Белая, Л.Я. Рожинская, Г.А. Мельниченко // Терапевтический архив. 2016. Т.88. №10. С.74-81.
2. Гребенникова, Т.А. Wnt10b и Wnt3a как биомаркеры изменений регуляции костного обмена у пациентов с болезнью Иценко-Кушинга / Т.А. Гребенникова, Ж.Е. Белая, А.Г. Солодовников [и др.] // Вестник Российской академии медицинских наук. 2018. Т.73. №2. С. 115-121.
3. Дыдыкина, И.С. Склеростин и его роль в регуляции метаболизма костной ткани / И.С. Дыдыкина, Е.С. Веткова // Науч.-практич. ревматол. 2013. Т.3. № 51. С. 296-301.
4. Камилов, Ф.Х. Минеральная плотность и показатели обмена костной ткани у взрослого населения, проживающего в йододефицитном районе / Ф.Х. Камилов, [и др.] // Медицинский вестник Башкортостана. 2020. Т.15. №1 (85). С. 26-30.
5. Лесняк, О.М. Остеопороз. Диагностика, профилактика и лечение: клинические рекомендации / О.М. Лесняк, Л.И. Беневоленская. М.:ГЭОТАР-Медиа, 2009. 27с.
6. Нуруллина, Г.М. Костное ремоделирование в норме и при первичном остеопорозе: значение маркеров костного ремоделирования / Г.М. Нуруллина, Г.М. Ахмадуллина // Архив внутренней медицины. 2018. №2. С.100-110.
7. Мамедова, Е.О. Антитела к склеростину как новая анаболическая терапия остеопороза / Е.О. Мамедова, Т.А. Гребенникова, Ж.Е. Белая, Л.Я. Рожинская // Остеопороз и остеопатии. 2018. Т.21. № 3. С. 21-29.
8. Меньшикова, И.А. Влияние стронция ранелата на метаболизм кости самок крыс при экспериментально моделированном дефиците половых гормонов / И.А. Меньшикова, Г.Р. Хабибуллина // Современные проблемы науки и образования. 2018. №2. (URL: <https://science-education.ru/ru/article/viewid=27483>).
9. Меньшикова, И.А. Распространенность остеопенического синдрома и степень кальцийурии у работниц химического производства / И.А. Меньшикова, Л.Ф. Муфазалова // Вестник Башкирского государственного медицинского университета. 2013. №1. С. 75-79.
10. Cosman, F. Romosozumab Treatment in Postmenopausal Women with Osteoporosis / F. Cosman, D.B. Crittenden, J.D. Adachi, [et al.] // N. Engl. J. Med. 2016. Vol.375. №16. P. 1532-1543.

11. Graeff, C. Administration of romosozumab improves vertebral trabecular and cortical bone as assessed with quantitative computed tomography and finite element analysis / C. Graeff, G.M. Campbell, J. Peña, [et al.] // *Bone*. 2015. Vol.81. P.364-369.
12. Holdsworth, G. Novel actions of sclerostin on bone / G. Holdsworth, S.J. Roberts, H.Z. Ke // *J. Mol. Endocrinol.* 2019. Vol.20. P.167-185.
13. Kim, S.W. Sclerostin Antibody Administration Converts Bone Lining Cells Into Active Osteoblasts // S.W. Kim, Y. Lu, E.A. Williams, [et al.] // *J. Bone Miner. Res.* 2017. Vol.32. №5. P.892-901.
14. Langdahl, B.L. Romosozumab (sclerostin monoclonal antibody) versus teriparatide in postmenopausal women with osteoporosis transitioning from oral bisphosphonate therapy: a randomised, open-label, phase 3 trial / B.L. Langdahl, C. Libanati, D.B. Crittenden, [et al.] // *The Lancet*. 2017. Vol.390. №10102. P.1585-1594.
15. Lewiecki, E.M. A Phase III Randomized Placebo-Controlled Trial to Evaluate Efficacy and Safety of Romosozumab in Men With Osteoporosis / E.M. Lewiecki, T. Blicharski, S. Goemaere, [et al.] // *J. Clin. Endocr. Metab.* 2018. Vol.103. №9. P.3183-3193.
16. Lewieski, E.M. Role of sclerostin in bone and cartilage and its potential as a therapeutic target in bone diseases / E.M. Lewieski // *Ther. Adv. Musculoskelet. Dis.* 2014. Vol. 2. №6. P.48-57.
17. Li, X. Targeted Deletion of the Sclerostin Gene in Mice Results in Increased Bone Formation and Bone Strength / X. Li, M.S. Ominsky, Q.T. Niu, [et al.] // *J. Bone Miner. Res.* 2008. Vol.23. №6. P. 860-869.
18. McClung, M.R. Inhibition of sclerostin with AMG785 in postmenopausal women with low bone mineral density: phase 2 trial results / M.R. McClung, A. Grauer, S. Boonen, [et al.] // *J. Bone Miner. Res.* 2013. Vol.1. №27. P.8.
19. McClung, MR. Romosozumab for the treatment of osteoporosis / M.R. McClung // *Osteoporosis and Sarcopenia*. 2018. Vol.4. №1. P.11-15.
20. Ominsky, M.S. Effects of sclerostin antibodies in animal models of osteoporosis / M.S. Ominsky, R.W. Boyce, X. Li, H.Z. Ke // *Bone*. 2017. Vol.96. P.63-75.
21. Padhi, D. Multiple doses of sclerostin antibody romosozumab in healthy men and postmenopausal women with low bone mass: A randomized, double-blind, placebo-controlled study / D. Padhi, M. Allison, A.J. Kivitz, [et al.] // *The Journal of Clinical Pharmacology*. 2014. Vol.54. № 2. P. 168-178.
22. Padhi, D. Single-dose, placebo-controlled, randomized study of AMG 785, a sclerostin monoclonal antibody / D. Padhi, G. Jang, B. Stouch, [et al.] // *J. Bone Miner. Res.* 2011. Vol.1. №26. P.19-26.

Сведения об авторах статьи:

Меньшикова Ирина Асхатовна - кандидат медицинских наук, доцент кафедры биологической химии ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа, ул. Ленина 3. e-mail: i-menshikova@bk.ru

Бикметова Эльвира Рафинатовна - кандидат биологических наук, доцент кафедры биологической химии ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет, г.Уфа, ул. Ленина 3. e-mail: eh19202082@yandex.ru

Камилов Феликс Хусаинович - доктор медицинских наук, профессор кафедры биологической химии ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа, ул. Ленина 3. e-mail: kamilovfx@yandex.ru

Галимов Шамиль Нариманович – профессор, доктор медицинских наук, декан медико-профилактического факультета с отделением биологии, заведующий кафедрой биологической химии ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа, ул. Ленина 3. e-mail: sngalim@mail.ru

Серета Е.Е.^{1,2}, Колегова Е.С.², Какурина Г.В.², Сиденко Е.А.^{1,2},
 Тарабановская Н.А.², Дорошенко А.В.², Кондакова И.В.²

СОПОСТАВЛЕНИЕ ПЯТИЛЕТНИХ РЕЗУЛЬТАТОВ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЬНЫХ ЛЮМИНАЛЬНЫМ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С АКТИВНОСТЬЮ ПРОТЕАСОМ

¹*Кафедра биохимии и молекулярной биологии с курсом КЛД ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск*
²*Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск*

Целью настоящего исследования явилось сопоставление показателей 5-летней общей и безметастатической выживаемости с активностью протеасом у больных различными вариантами люминального рака молочной железы. Всего в исследование было включено 117 пациенток (T₁₋₂N₀₋₁M₀). В опухолевой и перифокальной условно неизменной ткани молочной железы оценивались химотрипсиноподобная (ХПА) и каспазаподобная (КПА) активности протеасом флуориметрическим методом. Также определяли коэффициенты химотрипсинподобной активности протеасом (кХПА) и каспазаподобной активности протеасом (кКПА). Результаты: при всех вариантах люминального рака молочной железы в опухолевой ткани наблюдалось усиление протеолиза в сравнении с условно неизменной тканью. Общим показателем неблагоприятной 5-летней безметастатической выживаемости при люминальных раках было значение коэффициента каспазаподобной активности протеасом (кКПА) выше 2,21. При Люминальном В HER-2 отрицательном молекулярном подтипе рака молочной железы определение ХПА в опухоли также ассоциировано с показателями 5-летней безметастатической выживаемости. Полученные результаты свидетельствуют о возможности рассматривать определение активности протеасом в ткани для прогнозирования течения люминального рака молочной железы.

Ключевые слова: люминальный рак молочной железы, гематогенное метастазирование, активность протеасом, отдаленные исходы.

Sereda E.E.^{1,2}, Kolegova E. S.², Kokurina G.V.², Sidenko E. A.^{1,2},
 Tarabanovskaya N.A.², Doroshenko A.V.², Kondakova I.V.²

COMPARISON OF FIVE-YEAR RESULTS OF TREATMENT OF PATIENTS WITH LUMINAL BREAST CANCER WITH PROTEASOME ACTIVITY

¹*Department of biochemistry and molecular biology with the course of kld of the siberian state medical university of the ministry of health of the russian federation, Tomsk*
²*Research institute of oncology, tomsk national research medical center of the russian academy of sciences, Tomsk*

The aim of this study was to compare the indicators of 5-year general and metastatic survival with the activity of proteasomes in patients with various variants of luminal breast cancer. A total of 117 patients (T₁₋₂N₀₋₁M₀) were included in the study. In tumor and perifocal conditionally unchanged breast tissue, chymotrypsin-like (CPA) and caspase-like (KPA) proteasome activity was evaluated by fluorimetric method. The coefficients of chymotrypsin-like activity of proteasomes (kHPA) and caspase-like activity of proteasomes (kKPA) were also determined. Results: in all variants of luminal breast cancer, increased proteolysis was observed in the tumor tissue in comparison with conditionally unchanged tissue. The general indicator of unfavorable 5-year metastatic survival in luminal cancers was the value of the coefficient of caspase-like activity of proteasomes (cCPA) above 2.21. In the Luminal HER-2 negative molecular subtype of breast cancer, the determination of CPA in the tumor is also associated with the indicators of 5-year metastatic survival. The results obtained indicate that it is possible to consider the determination of the activity of proteasomes in the tissue for predicting the course of luminal breast cancer.

Key words: luminal breast cancer, hematogenous metastasis, proteasome activity, long-term outcomes.

Всесторонний интерес к изучению рака молочной железы (РМЖ) как с биохимических, так и с клинических позиций, связан с высокой распространенностью данной онкологической патологии во всем мире. Кроме того, показатели заболеваемости и смертности остаются стабильно высокими [4, 10, 13]. Выраженная гетерогенность рака

молочной железы осложняет понимание механизма развития данного заболевания и предсказание поведения опухоли в ответ на проводимую терапию [7,9,12,15,16].

Протеасомная система может рассматриваться в качестве возможных прогностических маркеров и параметров, влияющих на патогенетическую гетерогенность РМЖ, так как осуществляя полный или частичный протеолиз многочисленных субстратов, способна оказывать регулирующее влияние на ключевые процессы, происходящие на этапах развития и прогрессии опухоли (пролиферативная активность, апоптоз, неоангиогенез и функционирование иммунной системы, реорганизация актинового цитоскелета) [1,7,8]. Кроме того, адекватный протеолиз влияет на правильное функционирование и передачу сигналов рецепторами, ростовыми и транскрипционными факторами [7,13]. Ранее в наших исследованиях показана взаимосвязь протеасомной системы с процессами лимфогенного метастазирования [2]. Кроме того, известные в настоящее время мишени терапевтического воздействия, пути их регуляции доступности неразрывно связаны с механизмами прогрессирования, которые изучены недостаточно. Связи с этим поиск патогенетически обоснованных критериев прогноза течения РМЖ является актуальным.

Целью настоящего исследования явилось сопоставление показателей 5-летней общей и безметастатической выживаемости со значениями активности протеасомы у больных люминальным раком молочной железы.

Материал и методы

Всего в исследование было включено 117 пациенток люминальным РМЖ (T₁₋₂N₀₋₁M₀). У всех пациенток, включенных в исследование, был диагностирован инвазивный тип рака. Определение молекулярного подтипа выставлялся на основе определения в опухолевой ткани экспрессии рецепторов к эстрогенам (EP), к прогестерону (PP), к рецептору эпидермального фактора роста 2 типа (HER-2) и индекса пролиферативной активности Ki67. При люминальном А молекулярном подтипе выявлялся EP+, PP+, HER-2 негативный, Ki67 ≤ 20. Люминальный В РМЖ характеризуется EP+, PP+, Ki67 > 20, HER-2 статус может быть негативный и позитивный [3]. Распределение пациенток на различные молекулярные подтипы, а также сопоставимость групп исследования по клинко-морфологическим параметрам, представлено в таблице 1. В представленном исследовании изучалась перифокальная условно неизменная и опухолевая ткань молочной железы, полученная в ходе проведения хирургического этапа. Неоадьювантная терапия включенным в данное исследование пациентам не проводилась. В послеоперационном периоде лечение назначалось по показаниям, с учетом молекулярного подтипа первичной опухоли. Все пациенты проходили лечение в НИИ онкологии Томского НИМЦ.

Таблица 1

Клинико-морфологическая характеристика больных РМЖ

	Люминальный А, n=65	Люминальный В		Всего пациентов, n=117
		HER-2 негативный, n = 40	HER-2 позитивный, n= 12	
Размер опухоли				
T1	22 (34%)	15 (37.5%)	4 (33%)	41 (35%)
T2	43 (66%)	25 (62.5%)	8 (64%)	76 (65%)
Распространенность опухоли на регионарные лимфоузлы				
N0	38 (58%)	25 (62.5%)	5 (42%)	68 (58%)
N1	27 (42%)	15 (37.5%)	7 (58%)	49(42%)
5-летняя общая выживаемость	62 (95.4%)	35 (87.5%)	12 (100%)	109 (93.2%)
5-летняя безметастатическая выживаемость	56 (86.2%)	29 (72.5%)	9 (75%)	94(80.3%)

До проведения исследования образцы тканей замораживали и хранили при температуре - 80°C. Для определения активности протеасом в тканях сначала проводили этап получения осветленных гомогенатов путем диспергирования ультразвуковым гомогенизатором и ресуспендирования в 50 мМ трис-НСl буфере (рН=7,5), содержащем 2 мМ АТФ, 5 мМ хлорид магния, 1 мМ дитиотреитол, 1мМ ЭДТА и 100 мМ хлорид натрия. Соотношение ткань: буфер было равно 1:3. Гомогенат центрифугировали 60 минут при 10000g и 4°C.

Определение активности протеасом: в осветленных гомогенатах опухолевой и неизменной тканей молочной железы оценивали химотрипсиноподобную (ХПА) и каспазаподобную активности (КПА) протеасом по гидролизу флуорогенных олигопептидов Suc-LLVY-AMC или Cbz-LLG-AMC, соответственно, которые являются субстратами протеасом для соответствующих активностей [5,11]. Кроме того, нами было предложено оценивались уровень локального внутриклеточного протеолиза в конкретной опухоли по соотношению соответствующей активности протеасом в опухоли к активности в неизменной ткани. Полученные величины мы предложили называть как коэффициенты химотрипсинподобной и каспазаподобной активности протеасом, соответственно (кХПА и кКПА).

Статистический анализ: при статистическом анализе были использованы общепринятые статистические методы (Критерии Краскала-Уоллиса, Манна-Уитни, критерий Гехана-Вилкоксона, метод Каплана-Майера). При анализе выживаемости, расчет проводился на пятый год после проведения операции с учетом выбывших из-под наблюдения больных и умерших от сопутствующих не онкологических заболеваний. Общую

и безметастатическую продолжительность жизни исчисляли в месяцах с момента операции до времени выявления исхода (умер либо прогрессирование в виде развития гематогенных метастазов) или последнего посещения пациентом онколога на этапах динамического наблюдения. Под прогрессированием процесса понималось развитие гематогенных метастазов (метастатическое поражение костей таза, костей позвоночника, костей черепа, метастатическое поражение печени, легких, мозга, множественные отдаленные метастазы) в течении 5-летнего периода. Прогрессирование было отмечено у 13.8% пациентов люминальным А раком, у 27.5% пациентов люминальным В HER-2 отрицательном раке и у 25% Люминальном В HER-2 положительном РМЖ. Сроки наблюдения за больными составили от 3 до 60 месяцев.

Результаты

В таблице 2 представлены результаты по оценке активности протеасом в тканях при различных вариантах люминального РМЖ.

Таблица 2

Активность протеасом в тканях рака молочной железы, Me [Q25;Q75]

	Люминальны й А, n=65	Люминальный В		Всего пациентов, n=117
		HER-2 отрицательный, n = 40	HER-2 положительный, n= 12	
ХПА, 10 ³ Ед/мг белка Неизменная ткань,	13.06 [6.4; 33.3]	22.48 [8.9; 61.7]	14.07 [11.3; 21.2]	17.0 [7.52; 40.81]
Опухолевая ткань,	31.57* [16.4; 64.3]	45.71* [22.6; 148.9]	52.01* [19.8; 69.5]	35.9* [17.8; 81.94]
кХПА	2.11[1.1;3.8]	1.90 [1.1;3.3]	3.31 [1.4; 4.4]	2.16 [1.10; 4.02]
КПА, 10 ³ U/mg protein Неизменная ткань,	14.25 [8.3;32.2]	20.83 [10.9; 71.6]	16.14 [9.9; 36.9]	18.2 [9.6; 46.8]
Опухолевая ткань,	31.81* [16.7;116.1]	106.81* [28.2; 298.4]	59.33* [16.7; 121.2]	46.4* [18.7; 163.8]
кКПА	2.14 [1.2;4.7]	2.94 [1.4; 6.2]	2.89 [1.3; 8.1]	2.21 [1.3; 5.2]

* –значимость различий с группой неизменная ткань, p<0.01;

Усиление процессов внутриклеточного протеолиза за счет ХПА и КПА активности протеасом в опухолях, по сравнению с неизменными тканями наблюдалось при всех типах люминального рака молочной железы. Медианные значения ХПА и КПА протеасом в опухолевой ткани были выше в 2,4; в 2,7 раз соответственно, по сравнению с неизменной тканью ($p=0,000$; $p=0,000$, соответственно). Персонифицированная оценка изменения активности протеасом выполнялась путем определения коэффициентов соответствующих активностей. Была показана значительная вариабельность интенсивности локальных процессов протеолиза при люминальном РМЖ (табл 2).

На следующем этапе было проведено сопоставление показателей 5-летней общей и безметастатической выживаемости с протеолитической активностью протеасом в тканях молочной железы. Медианные значения ХПА, КПА, кХПА и кКПА, выявленные для общей группы РМЖ и представленные в таблице 2, были выбраны в качестве референсных уровней, разделяющих соответствующие активности на высокие и низкие (табл. 3).

Таблица 3

Показатели 5 - летней общей и безметастатической выживаемости больных РМЖ в зависимости от активности протеасом в тканях

Факторы	Количество пациентов, n	Кумулятивная доля выживших, (%)	
		5-летняя общая выживаемость	5-летняя безметастатическая выживаемость
ХПА в опухолевой ткани:		$p>0,05$	$p=0,008$
>35.9*10 ³ Ед/мг белка	58	94.83	89.66
≤35.9*10 ³ Ед/мг белка	59	91.23	73.68
кХПА		$p>0,05$	$p>0,05$
>2.16	58	92.16	86.27
≤2.16	59	94.12	76.47
КПА в опухоли:		$p>0,05$	$p>0,05$
>46.4* 10 ³ Ед/мг белка	61	93.88	85.71
≤46.4* 10 ³ Ед/мг белка	56	93.48	78.26
кКПА		$p>0,05$	$p=0,002$
>2.21	56	93.02	93.02
≤2.21	61	93.62	70.21

Показано наличие ассоциации ХПА в опухоли и кКПА протеасом только с показателями 5-летней безметастатической выживаемости (Gehan's-Wilcoxon Test: $p=0,008$ и $p=0,002$ соответственно). При этом, высокие значения ХПА и кКПА свидетельствовали о неблагоприятном прогнозе РМЖ в плане развития отдаленных метастазов. При ХПА протеасом в опухоли выше $35,9 * 10^3$ Ед/мг белка, показатели 5-летней безметастатической выживаемости составили $69.08\% \pm 6.27\%$, тогда как при низкой ХПА, показатели 5 летней безметастатической выживаемости составили $85.82\% \pm 5.56\%$ ($p=0,008$). При значении кКПА более чем 2.21, кумулятивный показатель 5-летней безметастатической выживаемости

составил $61.27\% \pm 7.49\%$, тогда как при низком значении данного коэффициента, показатели безметастатической выживаемости составили $90.13 \pm 6.28\%$ ($p=0,002$). Такие показатели как кХПА и КПА не были ассоциированы с показателями выживаемости. Общая выживаемость не была ассоциирована с активностью протеасом (табл. 3).

Далее были изучены показатели 5-летней общей и безметастатической выживаемости у больных РМЖ при различных вариантах люминального рака. Показатели 5-летней общей и безметастатической выживаемости при различных вариантах люминального рака были сопоставимы (для общей выживаемости $p=0.14$; использовался тест Gehan's Wilcoxon, так как при люминальном В HER-2 положительном молекулярном подтипе РМЖ, показатели общей выживаемости были равны 100%, для безметастатической выживаемости - $p=0.26$; $\chi^2=2.67$).

Оценивая сопряженность 5-летних результатов лечения больных с различными вариантами люминального рака молочной железы выявлено, что при люминальном А раке молочной железы 5-летняя безметастатическая выживаемость сопряжена только со значениями кКПА протеасом (Gehan's-Wilcoxon Test: $p=0,01$). При высоком значении кКПА 5-летняя безметастатическая выживаемость составила 62.2%, а при низком значении данного коэффициента – 94.4% ($p=0,01$). При Люминальном В HER-2 отрицательном РМЖ показатели 5-летней безметастатической выживаемости были ассоциированы с уровнем ХПА и кКПА (Gehan's-Wilcoxon Test: $p=0.02$ и $p=0.03$ соответственно). Значения 5-летней кумулятивной безметастатической выживаемости составило 52% при ХПА выше 35.9 Ед/мг белка. При низкой активности ХПА в опухоли у больных люминальным В HER-2 отрицательном молекулярном подтипе 5-летняя выживаемость составила 85.2%. ($p=0,02$). При значении кКПА выше 2.21 показатели выживаемости составили 53%, а при низком значении данного коэффициента 5-летняя выживаемость составила 83% ($p=0,03$). При люминальном В HER-2 положительном РМЖ, показатели внутриклеточных протеолитических систем не были ассоциированы с 5-летней безметастатической выживаемостью, что, вероятно, может быть обусловлено малым количеством выборки.

Таким образом, определение кКПА и ХПА протеасом в опухоли возможно использовать в качестве дополнительных прогностических признаков течения люминального рака молочной железы.

Литература

1. Какурина Г.В., Экспрессия генов, кодирующих белки клеточной подвижности, в развитии плоскоклеточных карцином головы и шей // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2018. Т. 166. № 8. С. 209-212.

2. Стенина М.Б., Практические рекомендации по лекарственному лечению инвазивного рака молочной железы / М.Б. Стенина, Л. Г. Жукова, И. А. Королева и др. // Злокачественные опухоли: Практические рекомендации RUSSCO 3s2. – 2018. – Т.8. - С. 113–144.
3. Шашова Е.Е., Изменение химотрипсинподобной и каспазаподобной активностей протеасом в зависимости от степени распространенности рака молочной железы / Шашова Е.Е., Кондакова И.В., Слонимская Е.М., Глущенко С.А., Колегова Е.С. // [Сибирский онкологический журнал](#). 2013. № 5. С. 45-49.
4. [Apuri S](#). Neoadjuvant and adjuvant therapies for breast cancer / [S. Apuri](#) // [South Med J](#). – 2017. - Vol. 110(10). – p. 638-642.
5. Ben-Shahar S. 26S proteasome-mediated production of an authentic major histocompatibility class I-restricted epitope from an intact protein substrate / S. Ben-Shahar, [A. Komlos](#), [E. Nadav](#) [et al.] // *J. Biol. Chem.* - 1999. - Vol. 274(31). - P. 2196-2197.
6. [Collins G.A](#). The logic of the 26S proteasome / [G.A. Collins](#), [A.L. Goldberg](#) // [Cell](#). – 2017. - Vol. 169(5). – p. 792-806.
7. Haque R. [Breast cancer outcomes in a racially and ethnically diverse cohort of insured women](#) / [R. Haque](#), [X. Xu](#), [J. Shi](#) [et al.] // *Ethn Dis.* – 2018. - Vol. 28(4). – p. 565-574.
8. Kondakova I. V., Shashova E. E., Sidenko E. A., Astakhova T. M., Zakharova L. A., Natalia P. Sharova N. P. Estrogen Receptors and Ubiquitin Proteasome System: Mutual Regulation. *Biomolecules*. 2020; 10(4): E500. doi: 10.3390/biom 10040500
9. Liu Z.F. [Clinicopathological characteristics and prognosis of different molecular types of breast cancer](#) / [Z.F. Liu](#), [C. Chen](#), [X.L. Yao](#) [et al.] // *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. – 2016. – Vol. 96(22). – p. 1733-1737.
10. Lim Y.J. [A Novel prognostic nomogram for predicting risks of distant failure in patients with invasive breast cancer following postoperative adjuvant radiotherapy](#) / [Y.J. Lim](#), [S.W. Lee](#), [N. Choi](#) [et al.] // *Cancer Res Treat.* – 2018. – Vol. 50(4). – p. 1140-1148.
11. Ma W. Proteasome enzymatic activities in plasma as risk stratification of patients with acute myeloid leukemia and advanced-stage myelodysplastic syndrome / Ma W., Kantarjian H., Bekele B., [et al.] // *Clin. Cancer Res.* - 2009. - vol 15. - p. 3820 - 3826.
12. Molnár I.A. [Breast carcinoma subtypes show different patterns of metastatic behavior](#) / I.A. Molnár, B.Á. Molnár, L. Vízkeleti [et al.] // *Virchows Arch.* – 2017. - Vol. 470(3). – p. 275-283.
13. Park M.H. [Elevated interleukin-13 receptor alpha 1 expression in tumor cells is associated with poor prognosis in patients with invasive breast cancer](#) / [M.H. Park](#), [H.J. Kwon](#), [J.R. Kim](#) [et al.] // *Ann Surg Oncol.* – 2017. - Vol. 24(12). – p. 3780-3787.

14. Schmidtke G. The 20S immunoproteasome and constitutive proteasome bind with the same affinity to PA28 $\alpha\beta$ and equally degrade FAT10 / G. Schmidtke, R. Schregle, G. Alvarez, [et al.] // Molecular Immunology. - 2017. - doi:10.1016/j.molimm.2017.11.030.
15. [Thangarajah](#) F. Retrospective analysis of Ki67 index and its prognostic significance in over 800 primary breast cancer cases / F. [Thangarajah](#), I. [Enninga](#), S.W. [Malter](#) [et al.] // [Anticancer Res.](#) – 2017. - Vol. 37(4). –p.1957-1964.
16. Winnike J.H. [Stable isotope-resolved metabolomic differences between hormone-responsive and triple-negative breast cancer cell lines](#) / J.H. Winnike, D.A. Stewart, W.W. Pathmasiri [et al.] // Int J Breast Cancer. – 2018. - Vol. 2018. – p. 1-12.

Сведения об авторах статьи:

Середа Елена Евгеньевна - д.м.н., доцент, кафедра биохимии и молекулярной биологии с курсом КЛД в ФГБОУ ВО СибГМУ, старший научный сотрудник, лаборатория биохимии опухолей, schaschovae@oncology.tomsk.ru

Колегова Елена Сергеевна - к.м.н., научный сотрудник, лаборатория биологии опухолевой прогрессии, elenakolegova@oncology.tomsk.ru

Какурина Гелена Валерьевна - к.м.н., старший научный сотрудник, лаборатория биохимии опухолей, kakurinagv@oncology.tomsk.ru

Сиденко Евгения Александровна - ассистент, кафедра биохимии и молекулярной биологии с курсом КЛД в ФГБОУ ВО СибГМУ, младший научный сотрудник, лаборатория биохимии опухолей, sidenkoevgeniyaaleksandrovna@gmail.com

Тарабановская Наталья Анатольевна - к.м.н., научный сотрудник, отделение общей онкологии, [E-mail: k_rose@mail.ru](mailto:k_rose@mail.ru)

Дорошенко Артем Васильевич - к.м.н., научный сотрудник отделения общей онкологии, E-mail: doroshenko@sibmail.com

Кондакова Ирина Викторовна д.м.н., профессор, зав. лабораторией, лаборатория биохимии опухолей; kondakova@oncology.tomsk.ru

Спирина Л.В.^{1,2}, Августинович А.В.¹, Афанасьев С.Г.¹
**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К
ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ**

¹*НИИ онкологии, Томский НИМЦ, г. Томск*

²*Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск*

В целом, понимание механизмов развития химиорезистентности является потенциальной возможностью выявления новых подходов в лечении пациентов раком желудка. Это до сих пор остается сложной клинической задачей, учитывая неутешительные результаты лечения, достигнутые с помощью только хирургического вмешательства или адъювантной, или неадъювантной химиотерапии. Считается, что развитие аутофагии определяет эффективность не только неадъювантной химиотерапии, но и может влиять на развитие ответа на таргетную, в том числе и иммунотерапию.

Цель работы: заключалась в изучении экспрессии транскрипционных, ростовых факторов, компонентов АКТ/mTOR сигнального пути, АМПК, связанных с эффектом лечения больных с аденокарциномами желудка.

Материалы и методы исследования. В исследование было включено 34 больных раком желудка, получавшим 3 курса химиотерапии по схеме FLOT. Материалом исследования была нормальная и опухолевая ткань, полученная при проведении диагностической гастроскопии у пациентов и после оперативного лечения, которые после забора замораживались и хранились при t -80⁰C. Экспрессия транскрипционных, ростовых факторов, компонентов АКТ/mTOR сигнального пути исследовали с помощью ПЦР в реальном времени. Содержание белка LC3B определяли методом Вестерн Блоттинг.

Результаты и их обсуждение. Выявлен рост ядерного фактора NF-κBp65, ростового фактора VEGF и VEGFR2, в также отмечена активация АКТ/m-TOR сигнального пути у пациентов с раком желудка с увеличением размера опухоли и появлении отдаленных метастазов. В опухоли отмечалось увеличение экспрессии белка LC3B и киназы АМПК на фоне опухолевой прогрессии.

После проведенной неадъювантной терапии выявлено увеличение экспрессии VEGF, CAIX в 5,1 раза в ткани опухоли желудка на фоне активации АКТ/mTOR сигнального пути и увеличение экспрессии LC3B в 5,12 раза по сравнению с таковым до терапии. При этом экспрессия 4EBP1 и содержание LC3B зависели от эффективности терапии.

Заключение. Размер опухоли и поражение регионарных лимфоузлов были связаны с модификацией молекулярных маркеров и изменением биологических свойств трансформированной ткани. На фоне неадъювантной терапии изменялся уровень мРНК генов *NF-κBp65*, *VEGF*, *VEGFR2*, *AKT*, *PDK* и *PTEN*. Отмечено влияние НАХТ на уровень мРНК LC3B. Содержание белка LC3B после терапии связано с эффективностью комбинированной терапии.

Ключевые слова: химиорезистентность, рак желудка, молекулярные маркеры.

Spirina L.V.^{1,2}, Avgustinovich A.V.¹, Afanasev S.G.¹
**MOLECULAR MECHANISMS OF RESISTANCE DEVELOPMENT TO ANTITUMOR
THERAPY**

¹*Cancer Research Institute, Tomsk National Research Center, Russian Academy of Medical
Sciences, Tomsk,*

²*Siberian State Medical University, Tomsk*

In general, understanding the mechanisms of development of chemoresistance is a potential opportunity to identify new approaches in treating patients with gastric cancer. It remains a challenging clinical challenge, given the disappointing treatment results achieved with surgery alone or adjuvant or neoadjuvant chemotherapy. It is believed that the development of autophagy determines the effectiveness of not only neoadjuvant chemotherapy but can also influence the development of a response to targeted, including immunotherapy. Purpose of the work: was to study the expression of transcriptional, growth factors, components of the АКТ / mTOR signaling pathway, АМПК associated with the effect of treatment of patients with gastric adenocarcinomas.

Materials and methods. The study included 34 patients with gastric cancer who received three courses of chemotherapy according to the FLOT scheme. The material of the study was normal, and tumor tissue was obtained during diagnostic gastroscopy in patients and after surgical treatment, which, after collection, were frozen and stored at t -800C. The expression of transcriptional, growth factors, components of the АКТ/mTOR signaling pathway was investigated using real-time PCR. The LC3B protein content was determined by Western Blotting.

Results and its discussion. We found the growth of the nuclear factor NF-κBp65, the growth factor VEGF and VEGFR2. An increase in the expression of the LC3B protein and АМПК kinase was noted against the background of tumor progression. The АКТ/ m-TOR signaling pathway activation was also indicated in patients with gastric cancer with an increase in tumor size and the appearance of distant metastases.

After the performed neoadjuvant therapy, an increase in the VEGF, CAIX expression by 5.1 times in the cancers was revealed with the АКТ / mTOR signaling pathway activation. We showed an increase in LC3B expression by 5.12

times compared with that before therapy. The expression of 4EBP1 and the content of LC3B depended on the effectiveness of therapy.

Conclusion. Tumor size and regional lymph node involvement were associated with the modification of molecular markers and changes in the biological properties of the transformed tissue. The mRNA level of *NF-κBp65*, *VEGF*, *VEGFR2*, *AKT*, *PDK* и *PTEN* are changed. The effect of NACT on the level of LC3B mRNA was noted. The LC3B protein content after therapy is associated with the efficacy of the combination therapy.

Keywords: Chemoresistance, stomach cancer, molecular markers.

Рак желудка — это заболеванием с агрессивной биологией и, как известно, в конечном итоге распространяется одновременно по нескольким метастатическим путям, создавая смешанную картину неудачи лечения. Резистентность к химиотерапии давно признана основной проблемой в терапии рака, снижающей цитотоксическую активность противораковых агентов [4]. Основными факторами устойчивости к терапии являются прямая инактивация лекарственного средства, изменение лекарственной мишени, отток лекарственного средства, повреждение ДНК, дефекты репарации ДНК, торможение гибели клеток, ЭМТ, гетерогенность, присущая клеткам, эпигенетические эффекты или любая комбинация этих механизмов [3].

Поиск биологических факторов опухоли на основе молекулярных сигнальных каскадов, в том числе АКТ/mTOR, способных предсказать предполагаемый ответ на лечение является актуальной задачей современной онкологии [5, 8]. Учитывая их значимость в развитии злокачественных новообразований, возможно они способны оказывать различное влияние на возникновение и рост опухолей различного происхождения.

При раке желудка имеются немногочисленные противоречивые сведения о роли генов, киназ АКТ/mTOR пути в развитии рака желудка. Известно, что мутации гена Р13С наблюдаются от 10,6% до 15,9% случаев заболевания [1, 7], что сочетается с дефицитом онкосупрессора РТЕН в 20-36% случаев [9]. В тоже время активация киназ АКТ, m-TOR, наблюдается в 80% и 47-64% опухолей желудка [7], что сочетается с неблагоприятным прогнозом заболевания.

Модификация АКТ/m-TOR пути может влиять на развитие резистентности к многим видам противоопухолевого лечения. Полагают, что низкая эффективность химиотерапии связана с изменением активности киназ данного сигнального пути, что осуществляет за счет множества молекулярных механизмов [2, 6], способствуя активации процессов опухолевой прогрессии.

Развитие рака желудка тесным образом связано с аутофагией. Этот процесс играет двойную роль при раке желудка, включая роль супрессора опухоли и роль промотора опухоли. Показано, что инициация аутофагии коррелируют с агрессивным течением заболевания и его плохим прогнозом. Молекулярные каскады, регулирующие аутофагию

многочисленны и разнообразны, и играют роль в онкогенезе, которая до сих пор остается не изученной.

В целом, понимание механизмов развития химиорезистентности является потенциальной возможностью выявления новых подходов в лечении пациентов раком желудка. Это до сих пор остается сложной клинической задачей, учитывая неутешительные результаты лечения, достигнутые с помощью только хирургического вмешательства или адъювантной, или неадъювантной химиотерапии. Считается, что развитие аутофагии определяет эффективность не только неадъювантной химиотерапии, но и может влиять на развитие ответа на таргетную, в том числе и иммунотерапию.

Цель работы: заключалась в изучении экспрессии транскрипционных, ростовых факторов, киназ АКТ/mTOR сигнального каскада, АМПК, связанных с эффектом лечения больных с новообразованиями желудка.

Материалы и методы исследования

В исследование было включено 34 больных раком желудка, получавшим 3 курса химиотерапии по схеме FLOT. Оценка эффективности комбинированного лечения больных местно-распространённым раком желудка проводилась по шкале RECIST 1.1. Материалом исследования была нормальная и опухолевая ткань, полученная при проведении диагностической гастроскопии у пациентов и после оперативного лечения, которые после забора замораживались и хранились при t -80⁰С.

Выделение РНК. РНК выделяли с помощью набора RNeasy mini Kit, содержащего ДНК-азу I (Qiagen, Germany).

Количественная ПЦР с обратной транскрипцией в режиме реального времени. Уровень экспрессии генов оценивали при помощи количественной обратно-транскриптазной ПЦР в режиме реального времени (RT-qPCR) с использованием красителя SYBR Green на амплификаторе iCycler (Bio-Rad, USA). Для получения кДНК на матрице РНК проводили реакцию обратной транскрипции с помощью набора ОТ m-MuLV-RN (БиоЛабмикс, Россия) со случайными гексануклеотидными праймерами в соответствии с инструкцией к набору. В качестве референсного гена использовали ген «домашнего хозяйства» фермента GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase).

Таблица

Последовательность праймеров проб исследованных генов

Ген	Ампликон	Последовательность
<i>CAIX</i> <u>NM_001216.2</u>	217 п.н.	F 5'-GTTGCTGTCTCGCTTGGAA-3' R 5'-CAGGGTGTCAGAGAGGGTGT-3'
<i>HIF-1α</i> <u>NM_001243084.1</u>	188 п.н.	F 5'- CAAGAACCTACTGCTAATGCCA-3' R 5'- TTTGGTGAGGCTGTCCGA-3'

Продолжение таблицы		
<i>NFKB1</i> NM_001165412.1	144 п.н.	F 5'-CGTGTAACCAAAGCCCTAAA-3' R 5'-AACCAAGAAAGGAAGCCAAGT-3'
<i>RELA</i> NM_001145138.1	271 п.н.	F 5'-GGAGCACAGATACCACCAAGA-3' R 5'-GGGTTGTTGTTGGTCTGGAT-3'
<i>PTEN</i> NM_001304717.2	136 п.н.	F 5'-GGGAATGGAGGGAATGCT-3' R 5'-CGCAAACAACAAGCAGTGA-3'
<i>EPAS1</i> NM_001430.4	265 п.н.	F 5'- TGGAGTATGAAGAGCAAGCCT-3' R 5'-GGGAACCTGCTCTTGCTGT-3'
<i>VEGFA</i> NM_001025366.2	316 п.н.	F 5'-AGGGCAGAATCATCACGAA-3' R 5'-TCTTGCTCTATCTTTCTTTGGTCT-3'
<i>4EBP1</i> NM_004095.3	244 п.н.	F 5'- CAGCCCTTTCTCCCTCACT -3' R 5'- TTCCCAAGCACATCAACCT -3'
<i>AKT1</i> NM_001014431.1	181 п.н.	F 5'- CGAGGACGCCAAGGAGA -3' R 5'- GTCATCTTGGTCAGGTGGTGT -3'
<i>c-RAF</i> NM_002880.3	152 п.н.	F 5'- TGGTGTGTCCTGCTCCCT -3' R 5'- ACTGCCTGCTACCTTACTTCCT -3'
<i>GSK3b</i> NM_001146156.1	267 п.н.	F 5'- AGACAAGGACGGCAGCAA -3' R 5'- CTGGAGTAGAAGAAATAACGCAAT -3'
<i>70S kinase alpha</i> NM_001272042.1	244 п.н.	F 5'- CAGCACAGCAAATCCTCAGA -3' R 5'- ACACATCTCCCTCTCCACCTT -3'
<i>mTOR</i> NM_004958.3	160 п.н.	F 5'- CCAAAGGCAACAAGCGAT-3' R 5'- TTCACCAAACCGTCTCCAA -3'
<i>PDK1</i> NM_001278549.1	187 п.н.	F 5'- TCACCAGGACAGCCAATACA -3' R 5'- CTCCTCGGTCACTCATCTTCA -3'
<i>LC3B</i> NM_032514.4	646 п.н.	F 5'- CCCAAACCGCAGACACAT-3' R 5'-ATCCCACCAGCCAGCAC-3'
<i>AMPK</i> NM_006252.4	321 п.н.	F 5'- AAGATGTCCATTGGATGCACT-3', R 5'-TGAGGTGTTGAGGAACCAGAT-3'
<i>GAPDH</i> NM_001256799.2	138 п.н.	F 5'- GGAAGTCAGGTGGAGCGA-3' R 5'-GCAACAATATCCACTTTACCAGA-3'

Примечание: NM – номер последовательности РНК в NCBI Nucleotide Database; F – прямой праймер; R – обратный праймер.

Получение гомогенатов. Замороженную ткань (100 мг) гомогенизировали в жидком азоте, затем ресуспендировали в 300 мкл 50 мМ трис-НСl буфера (рН=7,5), содержащего 2 мМ АТФ, 5 мМ хлорид магния, 1 мМ дитиотреитол, 1мМ ЭДТА и 100 мМ хлорид натрия.

Электрофорез. Электрофорез проводили по Laemmli в 13% полиакриламидном геле.

Вестерн блоттинг. После электрофореза переносили полипептиды на PVDF-мембрану (Immobilon, Millipore, США). Иммунодетекцию проводили с антителами к LC3B (Affinity Biosciences, USA). Анализ результатов осуществляли с использованием системы

визуализации ChemiDocTM Touch Imaging System. Стандартизация проводилась относительно β -актина.

Статистическую обработку результатов проводили с применением пакета программ Statistica 12.0. Результаты определения экспрессии генов представлены как медиана (нижний квартиль; верхний квартиль). Значимость различий оценивали по критерию Манна-Уитни. Различия считали значимыми при $p < 0.05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Исследуемые молекулярные маркеры играют значимую роль в онкогенезе, определяя не только развитие опухоли, но и прогрессирование заболевания. Выявлено, что размер опухоли желудка был связан с экспрессией ядерного фактора NF- κ Bp65 и ростового фактора VEGF. Отмечен рост данных показателей в опухоли со стадией T₄N₀₋₂M₀ в 10,0 и 353,0 раза, соответственно, по сравнению с пациентами с размером опухоли T₃N₀₋₂M₀. При наличии отдаленных метастазов в ткани опухоли наблюдалось повышение экспрессии ядерного фактора NF- κ Bp65, VEGF в 1,9; 3,11 раза и снижение экспрессии рецептора VEGFR2 в 1,2 раза, соответственно, по сравнению с пациентами без отдалённых метастазов. В ткани больного рака желудка отмечена активация АКТ/m-TOR сигнального пути с увеличением уровня PDK, c-RAF, 70S 6 киназы в 6,5; 322 и 770 раза, соответственно, по сравнению с больными со стадией заболевания T₃N₀₋₂M₀. Отмечено увеличение экспрессии c-RAF, PTEN и снижение уровня мРНК mTOR при распространении заболевания на регионарные лимфоузлы и при увеличении их количества. При этом прогрессирование заболевания и развитие отдаленных метастазов у больных было связано с увеличением экспрессии гена PDK и PTEN в 11,5 и 6,3 раза, соответственно, и снижением экспрессии гена АКТ в 687,4 раза, соответственно, по сравнению с пациентами без диссеминации.

Отмечалось увеличение экспрессии белка LC3B при увеличении размера опухоли. При изучении экспрессии белка LC3B было выявлено увеличение экспрессии белка при поражении лимфатических узлов и увеличении их количества. Активатор аутофагия киназа АМПК также подвергалась изменениям, связанным с процессами онкогенеза. При увеличении размером опухоли увеличивается экспрессия АМПК в ткани рака желудка. Биологические свойства трансформированной ткани влияют на молекулярную картину, которая ассоциирована с ростом опухоли, распространением заболевания, в том числе способствующие формированию ответа на терапию.

При исследовании уровня показателей после проведенной неоадьювантной терапии выявлено увеличение экспрессии VEGF в 7,25 и CAIX в 5,1 раза в ткани опухоли желудка. Отмечено увеличение экспрессии всех компонентов данного каскада, за исключением mTOR

и АКТ, которые снижались на фоне роста фосфатазы PTEN. При исследовании уровня показателей после проведенной неoadьювантной терапии выявлено снижение экспрессии 4EBP1 в 2,2 раза в ткани опухоли. После лечения отмечается увеличение экспрессии LC3B в 5,12 раза по сравнению с таковым до терапии. Содержание белка LC3B после терапии связано с эффективностью комбинированной терапии и возрастало при снижении эффекта лечения. Выявленный факт подтверждает значимость высокого содержания LC3B, ассоциированную с неблагоприятным исходом заболевания и развитием резистентности к терапии.

Заключение

Размер опухоли и поражение регионарных лимфоузлов были связаны с изменением экспрессии NF-κB p65, VEGF, VEGFR2, PDK, c-RAF, 70S 6 киназы, c-RAF, PTEN, mTOR. На фоне неoadьювантной терапии наблюдается модификация инвазивного и метастатического потенциала опухоли. Выявлены молекулярные маркеры, предсказывающие ответ опухоли на лечение, к которым относится экспрессия mTOR и 4EBP1. Отмечено влияние НАХТ на уровень мРНК LC3B. Содержание белка LC3B после терапии связано с эффективностью комбинированной терапии.

Литература

1. Barbi S, Cataldo I, De Manzoni G, Bersani S, Lamba S, Mattuzzi S, Bardelli A, Scarpa A. The analysis of PIK3CA mutations in gastric carcinoma and metanalysis of literature suggest that exon-selectivity is a signature of cancer type. *J Exp Clin Cancer Res.* 2010 Apr 16;29(1):32. doi: 10.1186/1756-9966-29-32.
2. Geng M, Wang L, Li P. Correlation between chemosensitivity to anticancer drugs and Bcl-2 expression in gastric cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2013 Oct 15;6(11):2554-9.
3. Jiang GM, Tan Y, Wang H, Peng L, Chen HT, Meng XJ, Li LL, Liu Y, Li WF, Shan H. The relationship between autophagy and the immune system and its applications for tumor immunotherapy. *Mol Cancer.* 2019 Jan 24;18(1):17. doi: 10.1186/s12943-019-0944-z.
4. Marin JJ, Monte MJ, Blazquez AG, Macias RI, Serrano MA, Briz O. The role of reduced intracellular concentrations of active drugs in the lack of response to anticancer chemotherapy. *Acta Pharmacol Sin.* 2014 Jan;35(1):1-10. doi: 10.1038/aps.2013.131.
5. Martelli AM, Evangelisti C, Chiarini F, McCubrey JA. The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mTOR signaling network as a therapeutic target in acute myelogenous leukemia patients. *Oncotarget.* 2010 Jun;1(2):89-103. doi: 10.18632/oncotarget.114.

6. Vadlakonda L, Pasupuleti M, Pallu R. Role of PI3K-AKT-mTOR and Wnt Signaling Pathways in Transition of G1-S Phase of Cell Cycle in Cancer Cells. *Front Oncol.* 2013 Apr 12;3:85. doi: 10.3389/fonc.2013.00085.
7. Velho S, Oliveira C, Ferreira A, Ferreira AC, Suriano G, Schwartz S Jr, Duval A, Carneiro F, Machado JC, Hamelin R, Seruca R. The prevalence of PIK3CA mutations in gastric and colon cancer. *Eur J Cancer.* 2005 Jul;41(11):1649-54. doi: 10.1016/j.ejca.2005.04.022.
8. Xing J, Liu R, Xing M, Trink B. The BRAFT1799A mutation confers sensitivity of thyroid cancer cells to the BRAFV600E inhibitor PLX4032 (RG7204). *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 Jan 28;404(4):958-62. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.12.088.
9. Zhu X, Qin X, Fei M, Hou W, Greshock J, Bachman KE, Kang J, Qin CY. Loss and reduced expression of PTEN correlate with advanced-stage gastric carcinoma. *Exp Ther Med.* 2013 Jan;5(1):57-64. doi: 10.3892/etm.2012.749.

Сведения об авторах статьи

Спирина Людмила Викторовна - д.м.н., в.н.с. лаборатории биохимии опухолей; профессор кафедры биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики НИИ онкологии Томского НИМЦ. 634050, Томская область, г. Томск, пер. Кооперативный, д.5.

Августиневич Александра Владимировна - к.м.н., старший научный сотрудник отделения абдоминальной онкологии НИИ онкологии Томского НИМЦ; Почтовый адрес: 634050, Томская область, г. Томск, пер. Кооперативный, д.5.

Афанасьев Сергей Геннадьевич - д.м.н., профессор, заведующий отделением абдоминальной онкологии НИИ онкологии Томского НИМЦ; Почтовый адрес: 634050, Томская область, г. Томск, пер. Кооперативный, д.5.

Baigildina A.A.^{1,2}**BIOCHEMICAL MECHANISMS OF ADAPTATION OF THE VASCULAR ENDOTHELIUM AT *PUUMALA*-ASSOCIATED HEMORRHAGIC FEVER WITH RENAL SYNDROME**¹*St Joseph University in Tanzania*²*St Joseph College of Health and Allied Sciences*

It has been determined blood levels of circulating endotheliocytes, VE-cadherin, VEGF, VCAM-1, endothelin-1, NO and ACE activity at *Puumala*-associated hemorrhagic fever with renal syndrome. Circulating endotheliocytes blood levels are significantly upregulated, while the level of VE-cadherin is significantly downregulated in all patient groups compared with healthy controls. VEGF and ET-1 blood levels are significantly upregulated in the febrile phase of the disease. Serum levels of stable NO metabolites and ACE activity are significantly higher than in healthy individuals. The most pronounced changes in all indicators were found in severe complicated HFRS. VCAM-1 blood levels are predominantly statistically significantly high at all forms of disease. It was concluded that the pathogenesis of *Puumala*-associated HFRS is accompanied by intensive desquamation of endotheliocytes, possibly due to the internalization of the VE-cadherin molecules. In moderate and severe uncomplicated HFRS, pronounced inflammation of the endothelium is observed, while the activity of this process in severe complicated disease is very weak, up to its complete endothelial an-reactivity. In moderate and severe uncomplicated HFRS, the endothelium is able to maintain normal vascular tone, however, in severe HFRS, there is a significant change in the synthesis of vasoactive substances that can contribute to the development of HFRS complications. It was concluded that *Puumala*-associated HFRS is associated with development of angiogenic, adhesive and vasomotor types of endothelial dysmetabolism.

Keywords: hemorrhagic fever with renal syndrome, endothelium; circulating endotheliocytes, VE-cadherin, VEGF, VCAM-1, endothelin-1, nitric oxide (II), ACE.

Endothelium is a unique tissue providing inner layer for organs of cardio-vascular system and consisting of 10^{14} cells. Endothelium plays the key role in regulation of hemostasis, blood vessel tone, angiogenesis, inflammation and macrophage activation [3]. Hypoxia, intoxication, hypercholesterolemia, hyperglycemia, and cytokines can affect endothelium activity causing up or down regulation of biologically active agents normally produced by endothelium.

Currently, it widely accepted that endothelia cells are the main target for viruses causing hemorrhagic fevers such as filoviruses [8], arenaviruses [10], flaviviruses [12], hantaviruses [14, 16, 24]. Published data demonstrated changed serum concentration of biologically active molecules produced by endothelial cells in patients with dengue, Ebola and Crimean-Congo, Argentine hemorrhagic fevers and hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) associated with *Seoul* virus [2, 5, 6, 9, 11, 15, 20, 23]. However, the role of biologically active substances produced by endothelial cells in pathogenesis of viral hemorrhagic fevers remains unknown. In addition, data on the metabolic status of the endothelium during infection of the human body with *Puumala* hantavirus remain limited. Therefore, the aim of the study was to determine the levels of circulating endothelial cells (CEs), VE-cadherin, vascular endothelial growth factor (VEGF), vascular endothelial cell adhesion molecule type 1 (VCAM-1), endothelin-1 (ET-1), nitric oxide (II) (NO), and angiotensin converting enzyme (ACE) activity in the blood serum/plasma of patients with *Puumala*-associated HFRS depending on stage and severity of disease to assess metabolic activity of the vascular endothelium and the extent of its damage by the *Puumala* virus or by products of changed metabolism induced by this infection agent.

Materials and Methods

To study the metabolic status of the endothelium have been enrolled 137 patients (114 men and 23 women) aged 21-62 years (average age 35.0 [25.0; 47.0] years) who have been medicated in hospitals of Ufa city (Russian Federation). Exclusion criteria were presence in anamnesis such diseases as arterial hypertension, heart and blood vessel diseases, diabetes mellitus, cancer, liver and kidney failure. The severity of HFERS has been confirmed according to classification by B.Z. Sirotin [21]. The moderate HFERS has been diagnosed in 61 patients (44.5%), severe uncomplicated - 43 patients (31.4%) and severe complicated type - 33 patients (24.1%). Complications were infectious toxic shock, acute renal failure, disseminated intravascular coagulation, acute respiratory failure, renal hematoma, acute erosive gastritis, acute respiratory failure, epistaxis and gastric bleeding, toxic metabolic encephalopathy with cerebral edema. In control group h 44 healthy individuals, matching by age and sex. Blood samples have been separated to obtain plasma or serum. Blood plasma/serum have been stored at -30°C until use. The number of CEs have been determined by J. Hladovec [7]. Phenotypic analysis of these cell has been performed by streptavidin method. Briefly, cell suspension has been incubated with anti-CD31 monoclonal antibodies (Dako; 1:50) followed by streptavidin staining. of VE-cadherin and sVCAM-1 blood levels have been determined by Bender MedSystem ELISA kit (Austria), VEGF blood levels - by BioSource ELISA kit (Belgium), ET-1 blood levels - by Biomedica Group ELISA kit (Austria), blood levels of the final metabolic products for NO - by R&D Systems kit (USA), ACE blood activity – by Buhlmann kit (Switzerland).

Statistical analysis has been performed by Statistica 7.0 (StatSoft, Inc., 2004) program. Results have been estimate by the nonparametric statistics: determined the Median (Me), the Interquartile Range (25% and 75%), Maximum and Minimum and the results have been present as Me [25; 75] and Min – Max. The statistical significance of intergroup differences has been evaluated by the Mann-Whitney U criterion with the False Discovery Rate (FDR) correction for multiple comparings [4]. Statistical significance of the intergroup differences has been confirmed at a value of $p < 0.05$.

Results and discussion

It has been found significant upregulation of CEs in the blood of the HFERS patients in course of the disease excepting convalescent phase in severe complicated type as compared to healthy controls (Fig. 1).

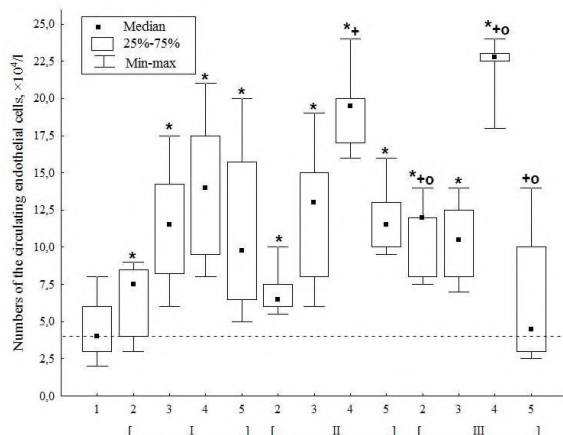


Fig. 1. Number of the CEs in the blood at *Puumala*-associated HFRS patients under standard medication.

Here and next: 1 – healthy control; 2 – febrile stage; 3 – oliguric stage; 4 – diuretic stage; 5 – convalescent stage.

I – moderate; II – severe uncomplicated; III - severe complicated HFRS.

p<0.05 comparing with: * - healthy control; + - moderate; o – severe uncomplicated HFRS; dotted line – Median for healthy control.

* - p<0.046 with FDR amendment

At febrile phase of moderate HFRS, amount of CEs has been upregulated in 1.5 times, while at severe uncomplicated disease it is upregulated in 1.8 versus healthy controls. A lot more of CEs - in 2.8 times higher comparing with healthy control has been found in the blood of patients with severe complicated HFRS. At oliguric period, CEs blood levels have been upregulated at 2.4; 2.9 and 3.6 times at moderate, severe uncomplicated and severe complicated HFRS respectively. During diuretic phase, number of CEs has been upregulated in 2.9; 3.5 and 5 times respectively. Finally, at convalescent phase, numbers of these cells blood levels have been in 3.4, 2.6 and 1.2 fold higher comparing with healthy control. Therefore, it has been concluded that the severity of HFRS is associated with severe endothelial desquamation. CEs levels are normalized only at convalescent phase of severe complicated HFRS. VE-cadherin in blood levels remained rather low regardless of the severity of the disease, and the most pronounced decrease in the level of this adhesive molecule was observed in patients with severe complicated HFRS (Fig. 2).

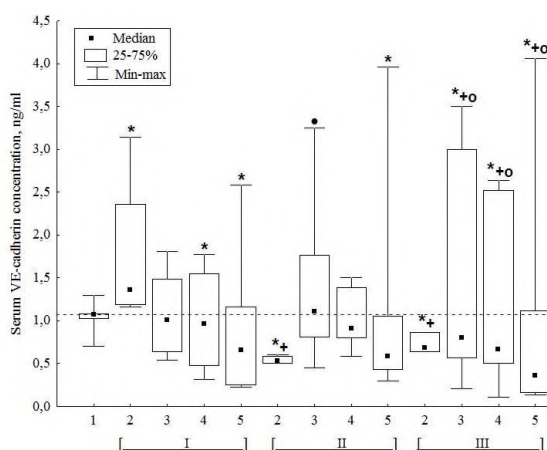


Fig. 2. VE-cadherin blood levels at *Puumala*-associated HFRS under standard medication.

* - p<0.02 with FDR amendment

Febrile phase of moderate HFRS has been characterized by upregulating of VE-cadherin blood levels: it has been downregulated in course of disease getting the levels in 1.6 times lower comparing with healthy controls in convalescent phase. Severe uncomplicated disease has been characterized by statistically significant downregulating of the VE-cadherin blood level (2.15 times

lower than in healthy controls). Cadherin blood levels has been gradually normalized at oliguric and diuretic stages of HFRS and gradually downregulated at convalescent phase of illness. Similar dynamics of the serum VE-cadherin has been detected at severe complicated HFRS. However, serum levels of this substance in severe complicated HFRS has been statistically lower during the entire illness. Therefore, it has been concluded that the more severe HFRS, the lower the VE-cadherin blood levels.

Dynamics of the VEGF blood levels differs from that for VE-cadherin, although, it remains closely associated with the severity of the disease (Fig. 3).

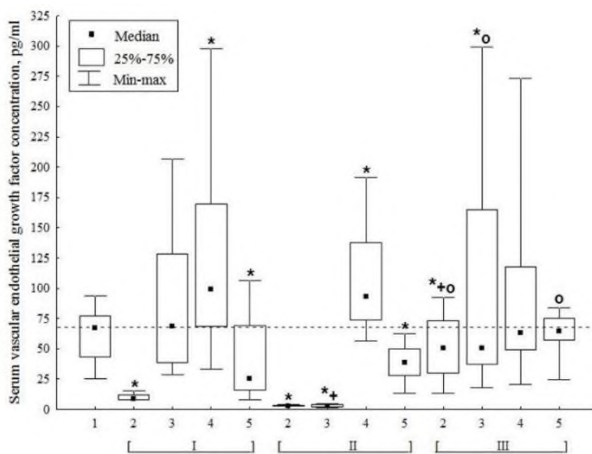


Fig. 3. Vascular endothelial growth factor blood levels at *Puumala*-associated HFRS under standard medication.
 * - $p < 0,046$ with FDR amendment

Serum VEGF levels have been found to increase up to the diuretic phase in all forms of the disease. However, its concentration has been significantly downregulated during the recovery phase and remained statistically significantly low in severe uncomplicated and complicated HFRS. In addition, blood concentrations of this growth factor have been significantly lower in severe uncomplicated form compared with moderate HFRS. VEGF levels rise sharply at the end of the oliguric phase and at the beginning of the diuretic phase (123.3-fold increase!) and have been significantly suppressed during the convalescent phase compared to healthy controls.

VCAM-1 blood levels have been significantly upregulated at moderate and severe uncomplicated HFRS as compared to healthy controls (Fig. 4).

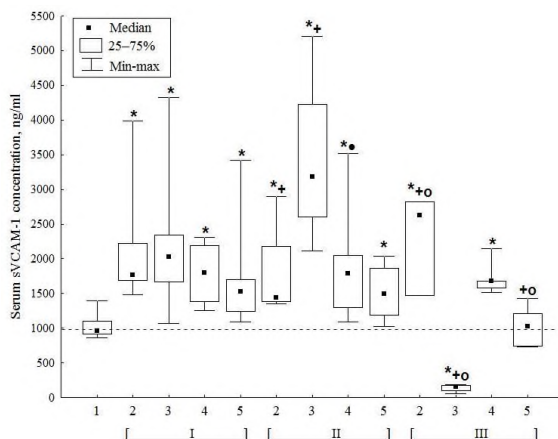


Fig. 4. VCAM-1 blood levels at *Puumala*-associated HFRS under standard medication.
 * - $p < 0,046$ with FDR amendment

VCAM-1 levels have been increased in 2.7 folds during febrile phase at severe complicated type as compared to healthy controls. Later, in the oliguric phase, its blood level decreased by 0.27 times, in the diuretic phase it has been upregulated by 1.7 times and then statistically normalized at the recovery phase.

ET-1 blood concentrations have been statistically lower in course of all types of HFRS with the lowest levels during febrile phase (Fig. 5).

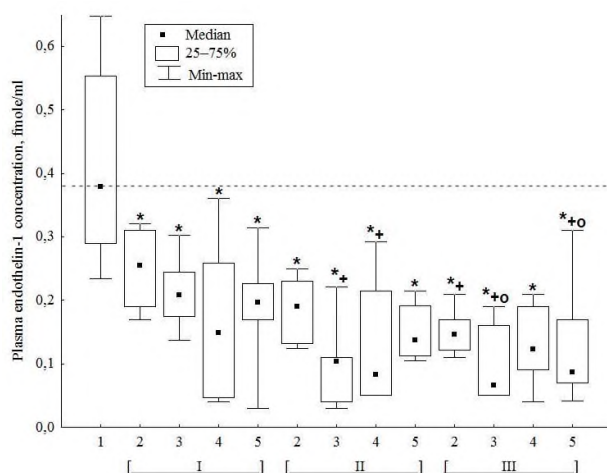


Fig. 5. Endothelin-1 plasma levels at *Puumala*-associated HFRS under standard medication.
 * - $p < 0.05$ with FDR amendment

Both moderate and severe uncomplicated HFRS have been characterized by graduate decrease of ET-1 serum levels from febrile to diuretic phase of the sickness. Interestingly that ET-1 levels have been significantly lower at severe uncomplicated HFRS as compared to that at moderate type of illness. Similar dynamics has been observed at severe complicated HFRS. This peptide blood levels have been significantly lower at severe complicated type as compared to severe uncomplicated disease.

NO blood levels have been upregulated at the beginning of the HFRS to its progressed and have been downregulated ed to convalescent phase (Fig. 6).

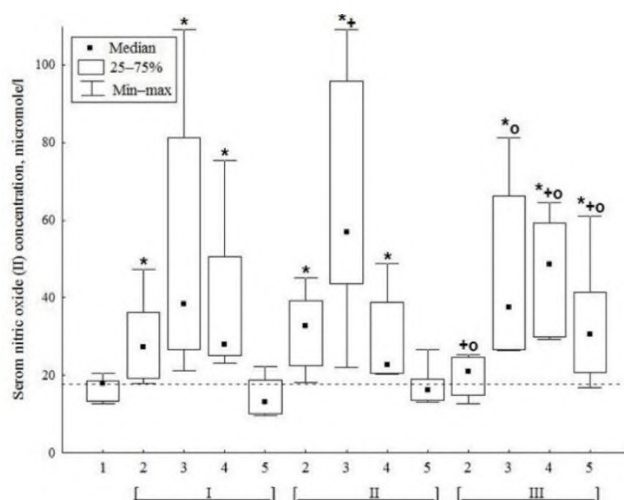


Fig. 6. Nitric oxide (II) blood levels at *Puumala*-associated HFRS under standard medication.
 * - $p < 0.045$ with FDR amendment

Changes in NO serum levels have been much more prominent at severe uncomplicated HFRS. Similarly, severe complicated illness has been characterized by upregulating of NO serum levels at all phases of the disease as compared to healthy controls and moderate and severe uncomplicated disease. Interestingly, levels of NO in serum of HFRS patients with severe complicated type have not been return to the levels in healthy controls at the convalescent stage.

Dynamics of serum ACE activity have been similar to that for NO (Fig. 7).

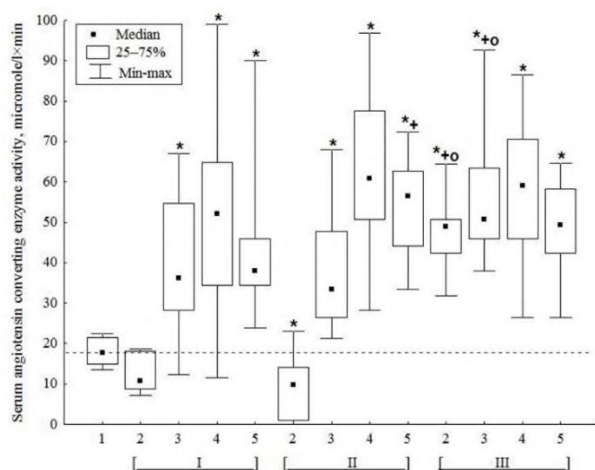


Fig. 7. Angiotensin-converting enzyme blood activity at *Puumala*-associated HFRS under standard medication. * - $p < 0.042$ with FDR amendment

ACE serum activity has been non-significantly reduced at febrile phase, significantly increased at all other remained phases of moderate HFRS as compared to healthy controls with maximal activity in the diuretic phase (3.1 folds increase). Similar dynamics of this enzyme activity has been observed at severe uncomplicated HFRS. Severe complicated disease has been characterized by ACE hyperactivity without any fluctuations at the course of disease. Increased activity of ACE has been significantly higher as compared to moderate type as well as severe uncomplicated type of disease.

Intensive desquamation of an endothelial cells at *Puumala*-associated HFRS in all types of severity has suggest damage to endothelium caused by hantavirus and products of dismetabolism such as reactive oxygen species, peroxinitrate, etc. It has been supposed that statistical downregulation of circulating endotheliocytes level during convalescent phase of the severe complicated type is due majority of the damaged cells to be detached at early phases of HFRS. Increased number of CEs has been also shown at denge hemorrhagic fever [5]. The severe disease the higher desquamation of the endothelium. Increased detaching of the endothelial cells results in exposure of sub-endothelial layer possessing pro-coagulating substances like collagen type IV. It can trigger activation of intrinsic clotting cascade. It can be one of the reasons of development of DIC-syndrome which can cause tissue ischemia and subsequent multiple organ failure development.

Predominantly reduced VE-cadherin production or its endocytosis may be the best way to counter forward hantavirus. Mackow et al. have confirmed that *in vitro* infecting of an endothelial cells with pathogenic hantaviruses *Hantaan* and *Andes* induces internalization of adhesive molecules [11]. On the contrary, when the endotheliocytes were infected with the non-pathogenic *Tula* hantavirus, the effect of internalization of these molecules has not been observed [10]. In addition, Schnitter et al. have established that supernatants collected from macrophages infected by *Marburg* virus induce reorganization of the VE-cadherin-catenin complex [19]. Downregulating of VE-cadherin expression by endothelial cells causes reducing of an intercellular contacts in the endothelial monolayer, that leads to increasing of the vascular wall permeability. High endothelial permeability is important to facilitate the migration of monocytes through this cellular monolayer. In addition, reduced VE-cadherin synthesis promotes elimination of infected endotheliocytes. This prevents the migration of infectious agents from one cell to another one. It would be expected that intensified ECs desquamation will trigger increased expression of VEGF as regeneration reaction of endothelium damaged by hantavirus. However, we have no observed any changes in VEGF blood levels. Therefore, we suppose that there is delaying of processes of endothelium reparation HFRS. Our data about VEGF blood levels at of HFRS differ from data obtained *in vitro* at infecting the endothelial cells by *Andes* hantavirus [20] and dengue virus [23]. We consider that differences in expression of VEGF in *Puumala* virus infected patients and *Andes* virus infected endothelial cells is due to adaptive delaying in production of VEGF which causes increased endothelial monolayer permeability, since permeability of the endothelium is already compromised by inflammation and increased serum levels of NO. Differences in the expression of VEGF at HFRS and dengue virus can be explained by the peculiarities in metabolic cell responses to invasion different viruses. Significant VCAM-1 synthesis upregulation at moderate and severe uncomplicated types of disease allow us to suggest that hantavirus is able to triggers the protective reaction of endothelial inflammation. Even higher increase in serum levels of VCAM-1 at severe uncomplicated HFRS suggests higher virus load leading to more inflammatory reaction. Decreased sVCAM-1 serum levels at severe complicated HFRS suggests weak inflammatory response due to weak activation of the immune response, which could be sign of the poor prognosis. Increased production of VCAM-1 has been shown in patients with Ebola and Marburg hemorrhagic fevers [18] and Crimean-Congo hemorrhagic fever patients [6], suggesting that this might be the universal metabolic reaction to viral hemorrhagic fevers.

Serum of ET-1 levels remained significantly low at all HFRS types. This could be explained as compensatory reaction for high levels of NO, since NO inhibits production of ET-1 by endothelial cells [1]. Our results are similar to those published by Jiang and colleague, where low

serum levels of ET-1 were observed in dengue fever patients [9]. Decreased levels of ET-1 during viral infection can promote facilitated extravasation of monocyte for the following their migration into the damaged tissue.

Serum levels of NO have been significantly increased in all types of HFRS. Similar results have been obtained by Valero and colleague in patients with dengue fever [25]. It can be explained by activation of both endothelial and inducible NO-synthases [13]. NO in high concentration, on the one side, causes vasodilation to facilitate migration of monocyte into inflamed tissue, on the other side, provide the marked antiviral activity [16, 17, 22].

ACE serum activity at HFRS remained up-regulated during all phases and types of the disease. We suppose that this is counterbalancing reaction as response of the body for low ET-1 serum levels and high NO serum concentration, aimed to support the normal arterial blood supply.

In conclusion, observed changes in metabolism of endothelial cells at *Puumala*-associated HFRS are aimed to protect endothelium from damage caused by hantavirus. At moderate and severe uncomplicated types of HFRS, endothelial cell desquamation is intensified. Never the less, endothelium remains metabolically active, that is it shows the metabolic reaction forward the virus infection by reducing production of both VE-cadherin and ET-1, by upregulating the synthesis of VCAM-1, ACE and NO. However, prominent damage of endothelial cells at severe complicated HFRS could explain decreased synthesis of compounds supporting the normal activity of endotheliocytes.

Thus, our data suggest that one of the key links in the pathogenesis of HFRS is the development of angiogenic, adhesive and vasomotoric types of endothelial dysmetabolism, and these changes in the structure and function of the inner lining of blood vessels are the basis for development of dangerous complications of *Puumala*-associated hemorrhagic fever with renal syndrome.

References

1. Alonso D., Radomski M.W. The nitric oxide – endothelin-1 connection // Heart Fail. Rev. - 2003. - V. 8. - P. 107-118.
2. Añez G., Valero N., Mosquera J.A. Role of nitric oxide in pathogenesis of dengue // Dengue Bull. - 2007. - V. 31. - P. 118-123.
3. Baumgartner-Parzer S.M., Waldhausl W.K. The endothelium as a metabolic and endocrine organ: its relation with insulin resistance // Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes. - 2001. - V. 109 (Suppl. 2). - P. 166-179.

4. Benjamini Y., Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing // *J. Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*. 1995. Vol. 57(1). P. 289-300.
5. Cardier J.E., Rivas B., Romano E. et al. Evidence of vascular damage in dengue disease: demonstration of high levels of soluble cell adhesion molecules and circulating endothelial cells // *Endothelium*. - 2006. - V. 13. - P. 335-340.
6. Connolly-Andersen A.M., Moll G., Andersson C. et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus activates endothelial cells // *J. Virol.* - 2011. - V. 85. - P. 7766-7774.
7. Hladovec J. Circulating endothelial cells as a sign of vessel wall lesions // *Physiol. Bohemoslov.* - 1978. - V. 27, No 2. - P. 140-144.
8. Hoenen T., Groseth A., Falzarano D. et al. Ebola virus: unravelling pathogenesis to combat a deadly disease // *Trends in molecular medicine*. - 2006. - V. 12. - P. 206-215.
9. Jiang L., Guo H., Fang D. Effect of dengue virus infection on the production of ET-1 and PGI₂ by human vascular endothelial cells // *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi*. - 1999. - V. 13. - P. 239-242.
10. Kunz S. The role of the vascular endothelium in arenavirus haemorrhagic fevers // *Thromb. Haemost.* - 2009. - V. 102. - P. 1024-1029.
11. Mackow E. R., Gavrillovskaya I. N. Hantavirus regulation of endothelial cell functions // *Thromb. Haemost.* - 2009. - V. 102, No 6. - P. 1030-1041.
12. Monath T.P., Barrett A.D. Pathogenesis and pathophysiology of yellow fever // *Adv. Virus Res.* - 2003. - V. 60. - P. 343-395.
13. Neves-Souza P.C., Azeredo E.L., Zagne S.M. et al. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in monocytes during acute Dengue fever in patients and during in vitro infection // *BMC Infect. Dis.* - 2005. - V. 5. - P. 64-69.
14. Pensiero M.N., Sharefkin J.B., Dieffenbach C.W. Hay J. Hantaan virus infection of human endothelial cells // *J. Virol.* - 1992. - V. 66. - P. 5929-5936.
15. Pereverten L.J., Ivanis V.A., Markelova E.V. Determining of metabolites of nitrogen oxide at a hemorrhagic fever with renal syndrome, associated with hantavirus Seoul. // *The 6th International Conference on Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome (HFRS), Hantavirus Pulmonary syndrome and Hantaviruses (Abstract Book)*. - Korea, Seoul. - 2004. - P. 162.
16. Peters C.J., Zaki S.R. Role of the endothelium in viral hemorrhagic fevers // *Crit. Care Med.* - 2002. - V. 30, No 5 (Suppl.). - P. 268-273.
17. Rodriguez-Ortega M. Nitric oxide in dengue pathology // *Acta Cient. Venez.* - 1998. - V. 49 (Suppl. 1). - P. 8-12.

18. Schnittler H.-J., Feldmann H. Molecular pathogenesis of filovirus infections: role of macrophages and endothelial cells // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* - 1999. - V. 235. - P. 175-204.
19. Schnitter H.-J., Ströher U., Afanasieva T. et al. Ebola and Marburg viruses - molecular and cellular biology // Norfolk, UK: Horizon Bioscience. - 2004. - P. 279-303.
20. Shrivastava-Ranjan P., Rollin P.E., Spiropoulou C.F. Andes virus disrupts the endothelial cell barrier by induction of vascular endothelial growth factor and downregulation of VE-cadherin // *J. Virol.* - 2010 - V. 84, No 21. - P. 11227-11234.
21. Sirotin B.Z. Hemorrhagic fever with renal syndrome // Chabarovsk: Chabarovsk territorial print shop. - 1994. - 300 p.
22. Takhampunya R., Padmanabhan R., Ubol S. Antiviral action of nitric oxide on dengue virus type 2 replication // *J. Gen. Virol.* - 2006. - V. 87. - P. 3003-3011.
23. Tseng C.S., Lo H.W., Teng H.C. et al. Elevated levels of plasma VEGF in patients with dengue hemorrhagic fever // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* - 2005. - V. 43, No 1. - P. 99-102.
24. Valbuena G., Walker D.H. The endothelium as a target for infections // *Annu. Rev. Pathol.* - 2006. - V. 1, No 1. - P.171-198.
25. Valero N., Espina L.M., Añez G. et al. Short report: increased level of serum nitric oxide in patients with dengue // *Am. J. Trop. Med. Hyg.* - 2002. - V. 66, No 6. - P. 762-764.

Information about the authors of the article

Baigildina Asii Akhmetovna - MMed, PhD, Dr Med Sci, Professor Department of Biomedical Sciences St Joseph University in Tanzania, St Joseph College of Health and Allied Sciences.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Саптарова Л.М., Кузьмина О.И.

ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ В СОВРЕМЕННОЙ МЕДИЦИНЕ

Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа

Представлен обзор применения технологий генной инженерии в медицине. Отмечается, что важное значение в медицине имеют подходы хромосомной инженерии. Хромосомные нарушения занимают одно из лидирующих мест среди причин наследственных заболеваний у человека. Технологии генной инженерии используются для точной и своевременной диагностики таких заболеваний путем идентификации хромосомных аномалий. В обзоре рассмотрены молекулярно-цитогенетические методы, используемые для определения хромосомных аномалий: флюоресцентной гибридизации *in situ* (fluorescence *in situ* hybridization – FISH) и сравнительной геномной гибридизации (comparative genomic hybridization – CGH). Дополнительно обсуждены перспективы применения данных методов в медицине.

Ключевые слова: генная инженерия, молекулярно-цитогенетические методы, флюоресцентная гибридизация – FISH, сравнительная геномная гибридизация – CGH.

Saptarova L.M., Kuzmina O.I.

GENE ENGINEERING IN MODERN MEDICINE

Bashkir State Medical University, Ufa

The article presents an overview of genetic engineering technologies in medicine, The importance of chromosome engineering methods is highlighted. Chromosomal abnormalities occupy one of the leading place among genetic disorders causes. Genetic engineering technologies are in use for precise and well-timed diagnostics of such disorders by identification of chromosomal abnormalities. In the review molecular cytogenetic methods for detection of chromosomal anomalies described, such as fluorescent hybridization *in situ* (fluorescence *in situ* hybridization, FISH) and comparative genomic hybridization (CGH) are described. Prospects of use in medicine of described technologies are discussed also.

Keywords: genetic engineering, molecular cytogenetic methods, fluorescent hybridization-FISH, comparative genomic hybridization– CGH.

Актуальность. Генная (или генетическая) инженерия включает любую прямую манипуляцию генов организма с помощью биотехнологических методов, что позволяет изучать функции конкретных участков генома, в том числе генов и некодирующих последовательностей. Генная инженерия делает возможным производить манипуляции над отдельными генами, включая и выключая их, делает возможным изменение продукта экспрессии гена, что позволяет осуществлять контроль за отдельными процессами в клетке и организме в целом. Технологии генетической инженерии активно применяются и развиваются в современной науке и находят широкое применение в медицине.

Цель исследования

Выявить комплекс молекулярно-генетических методов генной инженерии, с помощью которых можно осуществлять целенаправленное конструирование организмов путем манипуляций с помощью биотехнологических методов.

Генетика начала бурно развиваться в практическом и теоретическом направлении с 1900-х годов, когда было активно начато изучение закономерностей изменчивости живых организмов. К настоящему времени генетика развилась до целой отрасли науки и включает ряд дисциплин: цитогенетика, молекулярная генетика, иммуногенетика, фармакогенетика,

медицинская генетика и др. [3]. Генная инженерия включает ряд подходов направленных на изменения генетических характеристик известных вирусов и клеток, кроме того в рамках генной инженерии изучается целенаправленность использования перестроек естественного генома. В качестве примера технологии в рамках генной инженерии можно привести технологию встраивания целевых генов, имеющих происхождение из другого организма, в геном вирусов, что позволяет придать этим вирусам дополнительные онкогенные свойства [7,12].

Технологии в рамках генной (или генетической) инженерии можно условно поделить на 3 группы: генная инженерия собственно, геномная инженерия и хромосомная инженерия. Геномная инженерия включает подходы, применяемые для целенаправленной глубокой перестройки генома путем внесения дополнительно или удаления определенного количества генетической информации, что потенциально может приводить к созданию новых штаммов микроорганизмов, сортов растений, пород животных и даже новых видов организмов. На данный момент в основном применяется по отношению к прокариотам [10]. Мишенью другого подхода — хромосомной инженерии — являются хромосомы клеток эукариот. Данный подход имеет большое значение в современной медицине, так как именно вследствие хромосомной инженерии представляется возможным излечение наследственных заболеваний путем использования «здоровых» генов в интактных хромосомах организма [1].

Изучение хромосомных нарушений имеет важное значение в медицинской генетике. Хромосомы состоят из дезоксирибонуклеопротеидов (состоящих из ДНК и связанных с ней белков) и тем самым являются носителями наследственного кода организма. У здорового человека в большинстве клеток (кроме гамет) содержится 46 хромосом: 44 аутосомы (22 пары), идентичные у обоих полов, и 2 половые хромосомы — XX у женщин и XY у мужчин. Именно различия в половых хромосомах обуславливают половую дифференциацию у человека. Нормальное развитие яичников у женщин происходит только при наличии двух интактных X-хромосом, а семенников у мужчин при наличии одной X- и одной Y-хромосомы. Развитие некоторых патологических синдромов у человека связано с удвоением отдельных хромосом или дефицитом хромосом, так как это приводит к нарушению генного баланса, что приводит к нарушениям внутриутробного развития. При этом следует отметить то, что часто подобные перестройки набора хромосом могут быть несовместимы с жизнью [6].

Методы и исследования

Среди методов, применяемых в рамках генной инженерии для диагностики хромосомных аномалий, наиболее распространенным является цитогенетический метод,

который включает в себя культивирование клеток с целью получения их преимущественно в стадии метафазы клеточного цикла и последующее дифференциальное окрашивание хромосом по их длине. Кариотип в данном методе обычно изучают с помощью оптической микроскопии. Другие активно используемые методы, позволяющие исследовать хромосомные аномалии это флюоресцентная гибридизация *in situ* (fluorescence *in situ* hybridization – FISH) и сравнительная геномная гибридизация (comparative genomic hybridization – CGH). Данные методы основаны на процессе гибридизации гомологичных ДНК. Метод FISH использует взаимодействие одностранных последовательностей экзогенной ДНК, которая называется ДНК пробой и метится определенными флюоресцирующими веществами (флюорохромами), мишенями для антибиотиков или биотином, и тестируемой ДНК. Тестируемая ДНК в составе метафазных или интерфазных хромосом прикрепляется к подложке (например, предметному стеклу). Дополнительно для блокирования повторяющихся последовательностей в эксперименте используют короткие фрагменты ДНК, гомологичные этим повторам. Разрешающая способность молекулярно-цитогенетических методов определяется минимальным количеством нуклеотидов последовательности хромосомной ДНК, которую возможно регистрировать с помощью применяемой системы детекции, например оптической микроскопии. В качестве стандарта при анализе используются цитогенетические методы [5,10]. Схема проведения эксперимента с использованием метода FISH представлена на рис. 1.

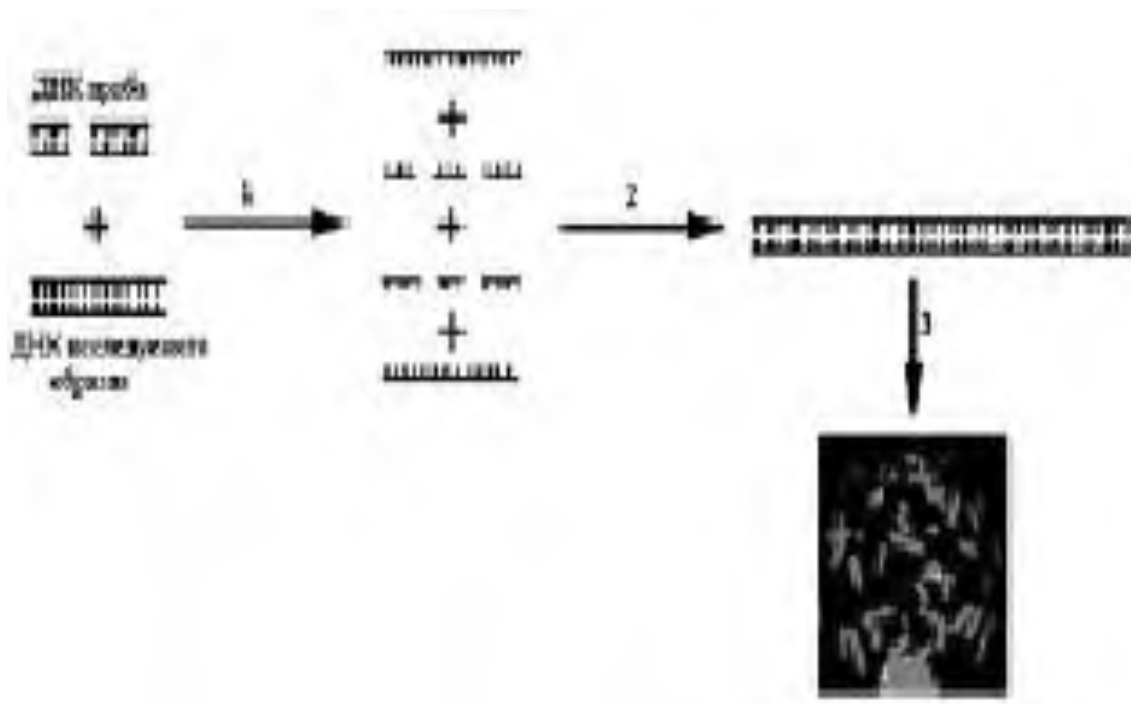


Рис. 1. Схематическое изображение метода FISH.

На первой стадией эксперимента происходит денатурация ДНК, в результате которой получают однонитевые молекулы ДНК. Например, смесь однонитевых последовательностей ДНК получают путем нагревания смеси ДНК пробы и ДНК тестируемого образца при температуре 72–75 °С. На втором этапе эксперимента происходит гибридизация – спаривание гомологичных последовательностей ДНК пробы и тестируемой ДНК, находящейся на цитологическом препарате в составе метафазных хромосом, а также и интерфазных ядер. Инкубацию как правило проводят длительное время (например, 12 часов) и с несколькими последовательными стадиями промывки (для удаления молекул ДНК пробы, которые не гибридизовались с ДНК тестируемого образца). Таким образом к концу инкубации происходит гибридизация ДНК пробы и ДНК тестируемого образца: ДНК проба, меченная флуорохромами, встраивается в ДНК тестируемого образца на препарате хромосом, с образованием гибридных двунитевых участков ДНК. В результате появляется возможность анализа флуоресцирующих последовательностей ДНК на предметном стекле *in situ* с помощью метода флуоресцентной микроскопии [8,13].

На сегодняшний день известен ряд модификаций метода FISH. Среди них можно упомянуть одноцветовой метод FISH с использованием ДНК-проб меченных одним флуорохромом (данный подход является основным молекулярно-цитогенетическим методом в диагностике хромосомных аномалий и применяется даже для определения редких перестроек структуры отдельных хромосом при недифференцированных формах наследственной патологии), многоцветовой метод FISH или MFISH, в которой каждая из ДНК-проб в ней метится флуорофором определенного цвета. Для идентификации сложных хромосомных перестроек также применяется модификация метода FISH с использованием ДНК-проб, маркирующих полностью пару гомологичных хромосом [6].

При исследовании численных хромосомных аномалий методом сравнительной геномной гибридизации (CGH) используют смесь тестируемой геномной ДНК пациента, меченной одним флуорохромом, и геномной ДНК донора, меченной другим флуорохромом. При исследовании структурных хромосомных аномалий применяется вариант метода с применением геномной ДНК пациента и ДНК какой-то конкретной хромосомы донора. Затем производится сравнительная оценка интенсивности суперпозиции сигналов двух разных флуорохромов (как правило с использованием компьютерного анализа), в результате чего становится возможным определение приобретения последовательности ДНК путем дупликации или инсерции или потери последовательности ДНК путем делеции в строго определенных хромосомах тестируемого образца пациента [2,4]. Схема проведения

эксперимента с использованием метода сравнительной геномной гибридизации на метафазных хромосомах представлена на рис.2.

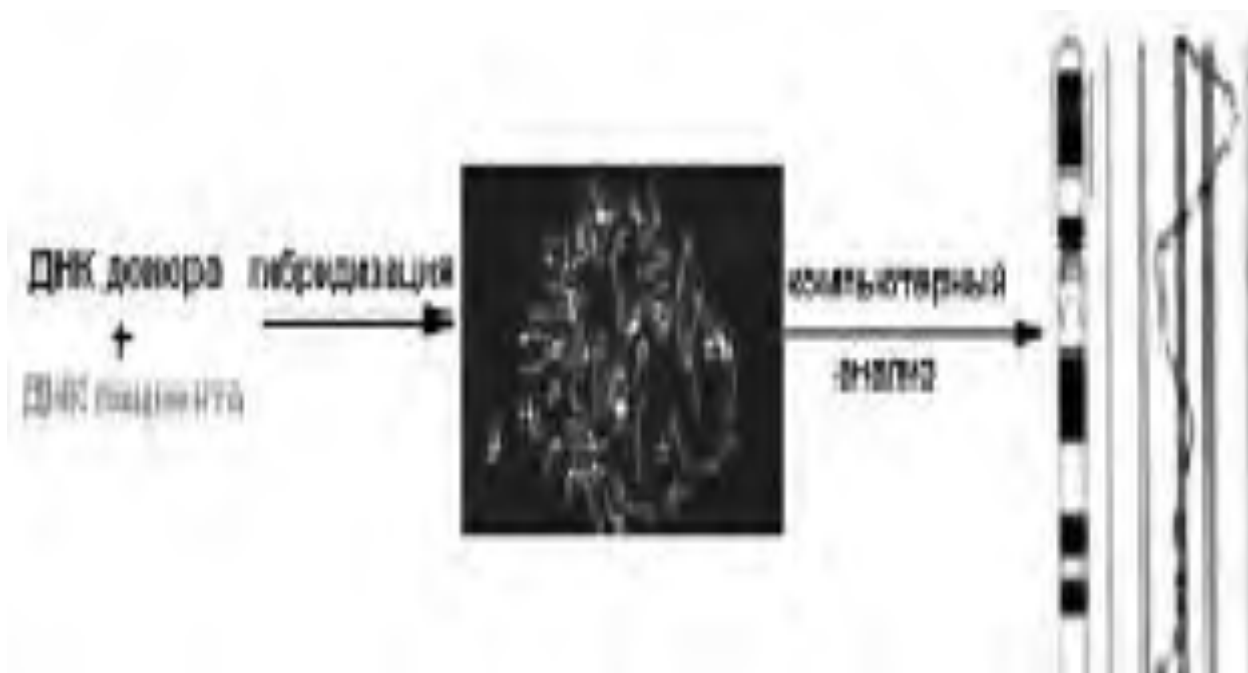


Рис. 2. Схематическое изображение метода сравнительной геномной гибридизации на метафазных хромосомах.

Гибридизация двух образцов геномной ДНК, которые были до этого маркированы разными флуоресцентными красителями (одним — ДНК пациента, другим — ДНК донора), происходит аналогично тому, как это осуществляется при эксперименте с использованием метода FISH. На следующем этапе соотношение интенсивностей флуоресцентных сигналов и, следовательно, степени гибридизации ДНК пациента и донора на метафазных хромосомах анализируется с помощью компьютерных методов. При этом считается, что соотношение 1:1 соответствует норме (отсутствию изменений в хромосомах); 1 (донор):0,5 (пациент) – делеции последовательности ДНК; 1 (донор):1,5 (пациент) – инсерции или дупликации последовательности ДНК. CGH анализ широко применяется в медицине в области онкологии (онкоцитогенетики), в диагностике умственной отсталости (для поиска нарушений одного из звеньев патогенетического каскада), также методика позволяет определить делеции (потерю) и дупликации (приобретение) последовательностей хромосомной ДНК [11,14].

Выводы

Молекулярно-цитогенетические методы исследования необходимы для:

- диагностики - распознавания хромосомных аномалий, идентификации, изучения всего спектра хромосомных отклонений (численных и структурных изменений генома).
- для поиска генетических причин недифференцированных и дифференцированных форм наследственных заболеваний, связанных с хромосомными перестройками, последующего

определения их генетических маркеров и изучения генетических и эпигенетических механизмов подобных наследственных заболеваний.

- цитогенетические методы геной инженерии могут быть использованы и в рамках медико-генетической консультации для определения носителей определенной хромосомной патологии, могут применяться у супружеских пар для выявления хромосомных аномалий, в том числе в виде “скрытого” минимального мозаицизма, либо при наличии дополнительной маркерной хромосомы. Точная, достоверная и своевременная диагностика хромосомных аномалий увеличивает эффективность генетического консультирования и пренатальной диагностики, в дальнейшем позволяет предупредить распространение наследственных заболеваний, связанных с хромосомными перестройками.

Литература

1. Бабаев А.А. Генная терапия: коррекция генетической информации. // Бабаев А.А, Ежова Г.П., Новикова Н.А., Новиков В.В. // Учебно-методические материалы по программе повышения квалификации «Хранение и обработка информации в биологических системах» Нижний Новгород. 2007, С. 49-74.
2. Нугис В.Ю. FISH- метод: способ цитогенетической ретроспективной оценки дозы. Радиоактивная медицина. Саратовский научно-медицинский журнал 2016, том 12, № 4, с 670-678.
3. Мандель Б.Р. Основы современной генетики. Учебное пособие для ВУЗ (бакалавриат) Москва. 2016.С. 80-283.
4. Миньженкова М.Е. Метафазная сравнительная геномная гибридизация в диагностике хромосомного дисбаланса. Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук. Москва. 2014. С. 32-42.
5. Политыко А.Д. Молекулярно-цитогенетический метод флуоресцентной *in situ* гибридизации (fish) в диагностике сложных форм хромосомной патологии // Политыко А.Д., Наумчик И.В., Хурс О.М., Исаакович Л.В. //инструкция по применению. «Республиканский практический центр «Мать и дитя». Минск, 2010. С. 5-18.
6. Солодкова О.А. Высокотехнологичные методы диагностики хромосомной патологии// Солодкова О.А., Зенкина В.Г. // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2016. № 6 (часть 2) С. 280-284.
7. Хандогина Е. К. Генетика человека с основами медицинской генетики //Хандогина Е. К., Терехова И. Д, Жилина С. С., Майорова М. Е., Шахтарин В. В.// учебник - 2-е изд., перераб. и доп. – Москва. ГЭОТАР-Медиа, 2014, с 3-14.

8. Хмелевская С.А. Новые биомедицинские технологии: философско-правовые проблемы. Социально-политические науки 2019, №4, 135-139.
9. Чилимбаева Г.А. Генная инженерия – веление времени // Чилимбаева Г.А., Айдана Маркабаева // Молодой ученый. — 2014. — № 8.1 (67.1). С. 31-33
10. Шарипова М.Р. Курс лекций по генетической инженерии. Учебное пособие. Казань. 2015. С.103-110.
11. Юров И. Ю. Молекулярно-цитогенетические методы. Цитогенетические, молекулярные и клинические основы генетически обусловленных болезней // Юров И.Ю., Ворсанова С.Г., Воинова В.Ю., Чурносов М. И., Юров Ю.Б. // Учебное пособие. Научная электронная библиотека. 2021 monographies.ru/ru/book/section?id=17015
12. <https://meduniver.com/Medical/Ginecologia/207.html> MedUniver
13. "Modern Problems of Science and Education. Surgery» (ISSN - 2686-9101)
14. Mustafin R.N. Khusnutdinova E.K. The Role of Reverse Transcriptase in the Origin of Life. Biochemistry. 2019. V 84. P. 870-883

Сведения об авторах статьи:

Сапгарова Лилияна Минкаировна - кандидат биологических наук, доцент кафедры биологической химии ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа, ул. Ленина 3. e-mail: SaptariovaLiliana@yandex.ru

Кузьмина Ольга Ильинична - кандидат биологических наук, доцент кафедры биологической химии ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа, ул. Ленина 3. e-mail: 050585@mail.ru

7. Jezupors, A. The analysis of infection after polypropylene mesh repair of abdominal wall hernia / A. Jezupors, M. Mihelsons // World J Surgery. 2006. Vol. 30, № 12. P. 2270–2278; discussion 2279–2280.

7. Информация об авторе (авторах).

Образец

Сведения об авторе статьи:

Иванов Иван Иванович – кандидат медицинских наук, доцент кафедры оперативной хирургии ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа, ул. Ленина 3. e-mail: ivanov@mail.ru

8. Следует использовать только общепринятые сокращения. Не следует применять сокращения в названии статьи. Полный термин, вместо которого вводится сокращение, следует расшифровать при первом упоминании его в тексте. Не требуется расшифровки стандартных единиц измерения и символов.

9. Таблицы должны иметь порядковый номер, расположенный в правом верхнем углу, название таблицы. Рекомендуется представлять наглядные, компактные таблицы. Все числа в таблицах должны быть выверены и соответствовать числам в статье.

Образец

Таблица 1

Сравнение среднего количества медицинских событий у пациентов с внебольничной пневмонией и метаболическим синдромом

Медицинские события	За 1 год до госпитализации, N=15	Через 1 год после госпитализации и, N=15	P
Обращения в поликлинику	6,1±2,0	8,2±1,6	0,023
Экстренная госпитализация	0,1±0,1	0,1±0,1	>0,05
Плановая госпитализация	0,2±0,1	0,2±0,1	>0,05
Вызовы скорой помощи	0,1±0,1	0,9±0,8	0,001
Всего	6,5±2,2	9,5±2,0	0,015

10. При использовании результатов статистического анализа данных обязательным условием является указанием использованного программного пакета и его версии, названий статистических методов, приведение описательных методов статистики и точных уровней значимости при проверке статистических гипотез. Для основных результатов исследования рекомендуется рассчитывать доверительные интервалы.

11. Единицы измерения физических величин должны представляться в единицах Международной метрической системы единиц-СИ.

12. Рисунки и диаграммы должны представляться отдельными графическими файлами в форматах bmp, jpg, tiff с указанием названия рисунка/диаграммы, его порядковым номером с разрешением не менее 300 dpi. В статье необходимо указывать место положения рисунка/диаграммы.

13. Все статьи, поступающие в редакцию, проходят многоступенчатое рецензирование, систему ANTIPLAGIAT, замечания рецензентов направляются автору без указания имен рецензентов. После получения рецензий и ответов автора редколлегия принимает решение о публикации статьи.

14. Редакция оставляет за собой право отклонить статью без указания причин. Очередность публикаций устанавливается в соответствии с редакционным планом издания журнала.

15. Редакция оставляет за собой право сокращать, редактировать материалы статьи независимо от их объема, включая изменения названия статей, терминов и определений. Небольшие исправления стилистического, номенклатурного или формального характера вносятся в статью без согласования с автором. Если статья перерабатывалась автором в процессе подготовки к публикации, датой поступления считается день поступления окончательного текста.

16. Направление в редакцию статей, которые уже посланы в другие журналы или напечатаны в них, не допускается.

17. Номера выходят по мере накопления статей, планируемая частота выхода – 6 номеров в год.