

ISSN 2542-1174



**JOURNAL**

**of SIBERIAN**

**MEDICAL**

**SCIENCES**

Vol. 8  
2024 **3**

**OPEN  
ACCESS**

# JOURNAL of SIBERIAN MEDICAL SCIENCES

Том 8, № 3 (2024)

Выходит 4 раза в год  
Издается с 2017 г.

Journal of Siberian Medical Sciences является преемником журнала «Медицина и образование в Сибири» (год издания 2006). Решением президиума ВАК РФ журнал включен в перечень периодических изданий, рекомендованных для публикации работ соискателей ученых степеней.

Журнал зарегистрирован в Федеральной службе по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор). Регистрационное свидетельство ПИ № ФС 77-72398 от 28 февраля 2018 г.

Журнал индексируется в РИНЦ, зарегистрирован в CrossRef с 2018 г., все статьи индексируются с помощью цифрового идентификатора DOI.

Редакция журнала соблюдает принципы международной организации «Комитет по издательской этике» (Committee On Publication Ethics — COPE).

Статьи, представленные к публикации в журнале, проходят независимое рецензирование и проверяются на оригинальность. При перепечатке материалов из журнала Journal of Siberian Medical Sciences ссылка на источник обязательна.

Журнал распространяется бесплатно. Территория распространения: РФ, страны СНГ, зарубежные страны. Электронная версия (аннотированное содержание) доступна по адресам: <http://jsms.ngmu.ru>, <https://elibrary.ru>

## РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

### ПРЕДСЕДАТЕЛЬ

*Маринкин И.О.*, д-р мед. наук, проф., зав. кафедрой акушерства и гинекологии, ректор, Новосибирский государственный медицинский университет (Новосибирск)

### ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

*Поспелова Т.И.*, д-р мед. наук, проф., зав. кафедрой терапии, гематологии и трансфузиологии факультета повышения квалификации и профессиональной переподготовки врачей, проректор по научной работе, Новосибирский государственный медицинский университет (Новосибирск)

### ЗАМЕСТИТЕЛЬ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

*Кузнецова В.Г.*, д-р мед. наук, проф. кафедры инфекционных болезней, Новосибирский государственный медицинский университет (Новосибирск)

### ОТВЕТСТВЕННЫЙ СЕКРЕТАРЬ

*Захарова К.Л.*, редактор Издательско-полиграфического центра, Новосибирский государственный медицинский университет (Новосибирск)

*Воевода М.И.*, д-р мед. наук, проф., директор Федерального исследовательского центра фундаментальной и трансляционной медицины (Новосибирск)

*Громб С.*, д-р медицины, проф., руководитель департамента судебной медицины университета Сегален (Бордо, Франция)

### УЧРЕДИТЕЛЬ

ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России: 630091, г. Новосибирск, Красный просп., 52. Тел./факс: +7 (383) 222-32-04. E-mail: [rector@ngmu.ru](mailto:rector@ngmu.ru), Web: [www.ngmu.ru](http://www.ngmu.ru)

*Давидович И.М.*, д-р мед. наук, проф. кафедры факультетской и поликлинической терапии с курсом эндокринологии, Дальневосточный государственный медицинский университет (Хабаровск)

*Жданов В.В.*, д-р мед. наук, проф., директор НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга Томского Национального исследовательского медицинского центра РАН (Томск)

*Локшин В.Н.*, д-р мед. наук, проф., академик НАН РК, президент Казахской ассоциации репродуктивной медицины, генеральный директор Международного клинического центра репродуктологии PERSONA (Казахстан, Алматы)

*Пузырев В.П.*, д-р мед. наук, проф., академик РАН, научный руководитель Томского Национального исследовательского медицинского центра РАН, научный руководитель НИИ медицинской генетики, зав. кафедрой медицинской генетики Сибирского государственного медицинского университета (Томск)

*Ружичка Т.*, д-р медицины, проф., руководитель департамента дерматологии и аллергологии Мюнхенского университета имени Людвига и Максимилиана (Мюнхен, Германия)

*Семенов В.М.*, д-р мед. наук, проф., зав. кафедрой инфекционных болезней, Витебский государственный медицинский университет (Республика Беларусь, Витебск)

*Федерико М.*, д-р медицины, проф., руководитель кафедры медицинской онкологии, отдел диагностической медицины, клиники и общественного здравоохранения, Университет Модены и Реджо-Эмилии (Италия, Модена)

*Шкурутий В.А.*, д-р мед. наук, проф., академик РАН, научный руководитель ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» (Новосибирск)

### АДРЕС ИЗДАТЕЛЯ И РЕДАКЦИИ

ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, 630091, Россия, г. Новосибирск, Красный пр., 52. Тел./факс: +7 (383) 229-10-82. E-mail: [mos@ngmu.ru](mailto:mos@ngmu.ru), Web: <http://jsms.ngmu.ru>

## 3.1. КЛИНИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА

*Абрамович С.Г.*, д-р мед. наук, проф., зав. кафедрой физиотерапии и курортологии, Иркутская государственная медицинская академия постдипломного образования – филиал Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования (Иркутск)

*Биттер И.*, д-р медицины, проф. департамента психиатрии и психотерапии, Университет Земмельвейса (Венгрия, Будапешт)

*Евстропов А.Н.*, д-р мед. наук, проф., зав. кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии, Новосибирский государственный медицинский университет (Новосибирск)

*Карбышева Н.В.*, д-р мед. наук, проф., зав. кафедрой инфекционных болезней с курсом ДПО, Алтайский государственный медицинский университет (Барнаул)

*Коваленко А.В.*, д-р мед. наук, проф., зав. кафедрой неврологии, нейрохирургии, медицинской генетики и медицинской реабилитации, Кемеровский государственный медицинский университет (Кемерово)

*Кулешов В.М.*, д-р мед. наук, проф. кафедры акушерства и гинекологии, Новосибирский государственный медицинский университет (Новосибирск)

*Курюшина О.В.*, д-р мед. наук, проф., заведующий кафедрой неврологии, Волгоградский государственный медицинский университет (Волгоград)

*Молчанова Е.Е.*, д-р мед. наук, доцент кафедры факультетской и поликлинической терапии, Амурская государственная медицинская академия (Благовещенск)

*Момот А.П.*, д-р мед. наук, проф. кафедры сестринского дела, Алтайский государственный медицинский университет (Барнаул)

*Мордык А.В.*, д-р мед. наук, проф., зав. кафедрой фтизиатрии, пульмонологии и инфекционных болезней, Омский государственный медицинский университет (Омск)

*Нильсон П.*, д-р медицины, проф. департамента клинических наук, Лундский университет (Швеция, Лунд)

*Охлопков В.А.*, д-р мед. наук, проф., ректор, Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии (Москва)

*Сагитова Г.Р.*, д-р мед. наук, проф., зав. кафедрой госпитальной педиатрии с курсом последипломного образования, Астраханский государственный медицинский университет (Астрахань)

*Самойлова Ю.Г.*, д-р мед. наук, проф., руководитель Центра клинических исследований, зав. кафедрой педиатрии с курсом эндокринологии, проф. кафедры факультетской терапии с курсом клинической фармакологии, Сибирский государственный медицинский университет (Томск)

*Селятицкая В.Г.*, д-р биол. наук, проф., главный научный сотрудник лаборатории эндокринологии, Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины (Новосибирск)

*Сенькевич О.А.*, д-р мед. наук, проф., зав. кафедрой педиатрии, неонатологии и перинатологии с курсом неотложной медицины, Дальневосточный государственный медицинский университет (Хабаровск)

*Смагина И.В.*, д-р мед. наук, проф., зав. кафедрой неврологии и нейрохирургии с курсом ДПО, Алтайский государственный медицинский университет (Барнаул)

*Трофименко И.Н.*, д-р мед. наук, доцент, зав. кафедрой клинической аллергологии и пульмонологии, Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования – филиал Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования (Иркутск)

*Федоров И.А.*, д-р мед. наук, доцент, зав. кафедрой факультетской педиатрии им. Н.С. Тюринной, Южно-Уральский государственный медицинский университет (Челябинск)

*Филлинок О.В.*, д-р мед. наук, проф., зав. кафедрой фтизиатрии и пульмонологии, Сибирский государственный медицинский университет (Томск)

*Хардикова С.А.*, д-р мед. наук, проф., зав. кафедрой дерматовенерологии и косметологии, Сибирский государственный медицинский университет (Томск)

*Хохлова З.А.*, д-р мед. наук, проф., зав. кафедрой инфекционных болезней, Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей – филиал ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» (Новокузнецк)

*Хрянин А.А.*, д-р мед. наук, проф. кафедры дерматологии и косметологии, Новосибирский государственный медицинский университет (Новосибирск)

*Цхай В.Б.*, д-р мед. наук, проф., зав. кафедрой перинатологии, акушерства и гинекологии, Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого (Красноярск)

*Шапошник И.И.*, д-р мед. наук, проф., зав. кафедрой пропедевтики внутренних болезней, Южно-Уральский государственный медицинский университет (Челябинск)

*Яхонтов Д.А.*, д-р мед. наук, проф. кафедры фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины, Новосибирский государственный медицинский университет (Новосибирск)

## 3.3. МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ

*Алябьев Ф.В.*, д-р мед. наук, проф., зав. кафедрой судебной медицины, Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого (Красноярск)

*Казачков Е.Л.*, д-р мед. наук, проф., зав. кафедрой патологической анатомии и судебной медицины им. проф. В.Л. Коваленко, Южно-Уральский государственный медицинский университет (Челябинск)

*Логвинов С.В.*, д-р мед. наук, проф., зав. кафедрой гистологии, эмбриологии и цитологии, Сибирский государственный медицинский университет (Томск)

*Надеев А.П.*, д-р мед. наук, проф., зав. кафедрой патологической анатомии, Новосибирский государственный медицинский университет (Новосибирск)

*Петрек М.*, д-р медицины, проф., руководитель департамента патологической физиологии Университета Полацкого (Чехия, Оломоуц)

*Савченко С.В.*, д-р мед. наук, проф. кафедры судебной медицины, Новосибирский государственный медицинский университет (Новосибирск)

*Сазонова Е.Н.*, д-р мед. наук, проф., зав. кафедрой нормальной и патологической физиологии, проректор по научной работе, Дальневосточный государственный медицинский университет (Хабаровск)

*Шевела А.И.*, д-р мед. наук, проф., заместитель директора по научной работе, Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск)

## 3.4. ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ НАУКИ

*Белуцов М.В.*, д-р фарм. наук, доцент, зав. кафедрой фармацевтического анализа, Сибирский государственный медицинский университет (Томск)

*Жариков А.Ю.*, д-р биол. наук, доцент, зав. кафедрой фармакологии им. проф. В.М. Брюханова, проректор по научной работе и инновациям, Алтайский государственный медицинский университет (Барнаул)

*Каракулова Е.В.*, д-р фарм. наук, проф. кафедры управления и экономики фармации, Сибирский государственный медицинский университет (Томск)

*Лаврентьева Л.И.*, д-р фарм. наук, доцент, зав. кафедрой управления и экономики фармации, декан фармацевтического факультета, Ярославский государственный медицинский университет (Ярославль)

*Мадонов П.Г.*, д-р мед. наук, проф., зав. кафедрой фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины, Новосибирский государственный медицинский университет (Новосибирск)

*Фоминых С.Г.*, д-р мед. наук, доцент, зав. кафедрой фармакологии, клинической фармакологии, Омский государственный медицинский университет (Омск)

*Шертаева К.Д.*, д-р фарм. наук, проф., зав. кафедрой организации и управления фармацевтического дела, Южно-Казахстанская медицинская академия (Шымкент, Казахстан)

# JOURNAL of SIBERIAN MEDICAL SCIENCES

Vol. 8, No. 3 (2024)

Quarterly  
Founded in 2017

The **Journal of Siberian Medical Sciences** is a successor to the “Medicine and Education in Siberia” online media that has been published since 2006. By the decision of the Presidium of the Higher Attestation Commission of the Russian Federation, the journal is included in the List of periodicals recommended for the publication of works by applicants for scientific degrees.

The **Journal of Siberian Medical Sciences** is registered with the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology and Mass Media (Roskomnadzor). Registration certificate PI No. FS 77-72398 dated Febr. 28, 2018.

The **Journal of Siberian Medical Sciences** is indexed in the RSCI, registered in CrossRef since 2018, all articles are indexed using a DOI digital identifier.

The editors of the journal observe the guidelines of the Committee on Publication Ethics (COPE).

Articles submitted for publication in the journal are independently reviewed and checked for originality. When reprinting materials from the Journal of Siberian Medical Sciences, reference to the source is required.

The magazine is distributed free of charge. Distribution area: Russian Federation, CIS countries, foreign countries. The electronic version (annotated content) is available at: <http://jsms.ngmu.ru>, <https://elibrary.ru>

## EDITORIAL COUNCIL

### CHAIRMAN

*Marinkin I.O.*, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof., Head of the Department of Obstetrics and Gynecology, Rector, Novosibirsk State Medical University (Novosibirsk)

### EDITOR-IN-CHIEF

*Pospelova T.I.*, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof., Head of the Department of Therapy, Hematology and Transfusiology, Vice-Rector for Research, Novosibirsk State Medical University (Novosibirsk)

### DEPUTY CHIEF EDITOR

*Kuznetsova V.G.*, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof. of the Department of Infectious Diseases, Novosibirsk State Medical University (Novosibirsk)

### EXECUTIVE SECRETARY

*Zakharova X.L.*, editor of the Publishing and Printing Center, Novosibirsk State Medical University (Novosibirsk)

*Voevoda M.I.*, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of the Russian Academy of Sciences, Head, Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine (Novosibirsk)

*Gromb S.*, MD, PhD, Prof., Head of the Department of Forensic Medicine, Bordeaux Segalen University (France, Bordeaux)

*Davidovich I.M.*, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof., Department of Faculty and Polyclinic Therapy with a Course of Endocrinology, Far Eastern State Medical University (Khabarovsk)

*Zhdanov V.V.*, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof., Head, Scientific Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine named after E.D. Goldberg, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences (RAS) (Tomsk)

*Lokshin V.N.*, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan, President of the Kazakhstan Association of Reproductive Medicine, General Director of International Clinical Center for Reproductology PERSONA (Kazakhstan, Almaty)

*Puzyrev V.P.*, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of the Russian Academy of Sciences, Scientific Director of the Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Scientific Director of the Scientific Research Institute of Medical Genetics, Head of the Department of Medical Genetics (Tomsk)

*Ruzicka Thomas*, MD, PhD, Prof., Head of Department of Dermatology and Allergy, Ludwig-Maximilian University of Munich (Germany, Munich)

*Semyonov V.M.*, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof., Head of Department of Infectious Diseases, Vitebsk State Medical University (Republic of Belarus)

*Federico M.*, MD, PhD, Prof., Head of the Department of Medical Oncology, Department of Diagnostic Medicine, Clinical and Public Health Care of the University of Modena and Reggio Emilia (Italy, Modena)

*Shkurupiy V.A.*, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of the Russian Academy of Sciences, Scientific Supervisor of the Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine (Novosibirsk)

### FOUNDER

Novosibirsk State Medical University:  
52, Krasny Prospect, Novosibirsk, 630091, Russia.  
Tel./fax: +7 (383) 222-32-04  
E-mail: [rector@ngmu.ru](mailto:rector@ngmu.ru), Web: [www.ngmu.ru](http://www.ngmu.ru)

### EDITORIAL OFFICE AND PUBLISHER ADDRESS

Novosibirsk State Medical University:  
52, Krasny Prospect, Novosibirsk, 630091, Russia.  
Tel./fax: +7 (383) 229-10-82.  
e-mail: [mos@ngmu.ru](mailto:mos@ngmu.ru), web: <http://jsms.ngmu.ru>

## EDITORIAL BOARD

### 3.1. CLINICAL MEDICINE

*Abramovich S.G.*, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof., Head of the Department of Physiotherapy and Balneology, Irkutsk State Medical Academy of Postgraduate Education – Branch of the Russian Medical Academy of Lifelong Professional Education (Irkutsk)

*Bitter Istvan*, MD, PhD, Prof., Chair Department of Psychiatry and Psychotherapy, Semmelweis University (Hungary, Budapest)

*Eustropov A.N.*, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof., Head of the Department of Microbiology, Virusology and Immunology, Novosibirsk State Medical University (Novosibirsk)

*Karbysheva N.V.*, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof., Head of the Department of Infectious Diseases with a Postgraduate Education Course, Altai State Medical University (Barnaul)

*Kovalenko A.V.*, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof., Head of the Department of Neurology, Neurosurgery, Medical Genetics and Medical Rehabilitation, Kemerovo State Medical University (Kemerovo)

*Kuleshov V.M.*, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof. of the Department of Obstetrics and Gynecology, Novosibirsk State Medical University (Novosibirsk)

*Kurushina O.V.*, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof., Head of the Department of Neurology, Volgograd State Medical University (Volgograd)

*Molchanova E.E.*, MD, Dr. Sci. (Med.), Associate Prof., Department of Faculty and Polyclinic Therapy, Amur State Medical Academy (Blagoveshchensk)

*Momot A.P.*, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof. of the Department of Nursing, Altai State Medical University (Barnaul)

*Mordyk A.V.*, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof., Head of the Department of Phthisiology, Pulmonology and Infectious Diseases, Omsk State Medical University (Omsk)

*Nilsson Peter M.*, MD, Prof., Department of Clinical Sciences, Lund University (Lund, Sweden)

*Okhlopkov V.A.*, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof., Rector of the Federal Research and Clinical Center for Resuscitation and Rehabilitation (Moscow)

*Sagitova G.R.*, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof., Head of the Department of Hospital Pediatrics with a Postgraduate Education Course, Astrakhan State Medical University (Astrakhan)

*Samoilova J.G.*, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof., Head of the Clinical Research Center, Head of the Department of Pediatrics with a course of Endocrinology, Prof. of the Department of Faculty Therapy with a course of Clinical Pharmacology, Siberian State Medical University (Tomsk)

*Selyatitskaya V.G.*, MD, Dr. Sci. (Biol.), Prof., Chief Researcher, Laboratory of Endocrinology,

Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine (Novosibirsk)

*Senkevich O.A.*, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof., Head of the Department of Pediatrics, Neonatology and Perinatology with the Course of Emergency Medicine, Far Eastern State Medical University (Khabarovsk)

*Smagina I.V.*, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof., Head of the Department of Neurology and Neurosurgery with a Postgraduate Education Course, Altai State Medical University (Barnaul)

*Trofimenko I.N.*, MD, Dr. Sci. (Med.), Associate Prof., Head of the Department of Clinical Allergy and Pulmonology, Irkutsk State Medical Academy of Postgraduate Education – Branch of the Russian Medical Academy of Lifelong Professional Education (Irkutsk)

*Fedorov I.A.*, MD, Dr. Sci. (Med.), Associate Prof., Head of the Department of Faculty Pediatrics named after N.S. Tyurina, South Ural State Medical University (Chelyabinsk)

*Filynyuk O.V.*, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof., Head of the Department of Phthisiology and Pulmonology, Siberian State Medical University (Tomsk)

*Khardikova S.A.*, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof., Head of the Department of Dermatovenereology and Cosmetology, Siberian State Medical University (Tomsk)

*Khokhlova Z.A.*, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof., Head of the Department of Infectious Diseases, Novokuznetsk State Institute for Advanced Medical Education – Branch of the Russian Medical Academy of Lifelong Professional Education (Novokuznetsk)

*Khryanin A.A.*, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof. of the Department of Dermatovenereology and Cosmetology, Novosibirsk State Medical University (Novosibirsk)

*Tskhay V.B.*, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof., Head of the Department of Perinatology, Obstetrics and Gynecology, Krasnoyarsk State Medical University named after professor V.F. Voyno-Yasenetsky (Krasnoyarsk)

*Shaposhnik I.I.*, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof., Head of the Department of Propaedeutics of Internal Diseases, South Ural State Medical University (Chelyabinsk)

*Yahontov D.A.*, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof. of the Department of Pharmacology, Clinical Pharmacology and Evidence-Based Medicine, Novosibirsk State Medical University (Novosibirsk)

### 3.3. MEDICAL AND BIOLOGICAL SCIENCES

*Alyabev F.V.*, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof., Head of the Department of Forensic Medicine, Krasnoyarsk State Medical University named after prof. V.F. Voyno-Yasenetsky (Krasnoyarsk)

*Kazachkov E.L.*, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof., Head of the Department of Pathological

Anatomy and Forensic Medicine named after prof. V.L. Kovalenko, South Ural State Medical University (Chelyabinsk)

*Logvinov S.V.*, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof., Vice Rector for Study, Head of the Department of Histology, Fetology and Cytology, Siberian State Medical University (Tomsk)

*Nadeev A.P.*, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof., Head of the Department of Pathological Anatomy, Novosibirsk State Medical University (Novosibirsk)

*Petrek Martin*, MD, PhD, Prof., Head of the Department of Pathological Physiology, Palacký University of Olomouc (Czech Republic, Olomouc)

*Savchenko S.V.*, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof. of the Department of Forensic Medicine, Novosibirsk State Medical University (Novosibirsk)

*Sazonova E.N.*, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof., Head of the Department of Normal and Pathological Physiology, Vice-Rector for Research, Far Eastern State Medical University (Khabarovsk)

*Shevela A.I.*, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof., Deputy Director for Research, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (Novosibirsk)

### 3.4. PHARMACEUTICAL SCIENCES

*Belousov M.V.*, MD, Dr. Sci. (Pharm.), Associate Prof., Head of the Department of Pharmaceutical Analysis, Siberian State Medical University (Tomsk)

*Zharikov A.Yu.*, Dr. Sci. (Biol.), Associate Prof., Head of the Department of Pharmacology named after professor V.M. Bryukhanov, Vice-Rector for Research and Innovation, Altai State Medical University (Barnaul)

*Karakulova E.V.*, Dr. Sci. (Pharm.), Prof. of the Department of Management and Economics of Pharmacy, Siberian State Medical University (Tomsk)

*Lavrenteva L.I.*, Dr. Sci. (Pharm.), Associate Prof., Head of the Department of Management and Economics of Pharmacy, Dean of the Faculty of Pharmacy, Yaroslavl State Medical University (Yaroslavl)

*Madonov P.G.*, MD, Dr. Sci. (Med.), Prof., Head of the Department of Pharmacology, Clinical Pharmacology and Evidence-Based Medicine, Novosibirsk State Medical University (Novosibirsk)

*Fominykh S.G.*, MD, Dr. Sci. (Med.), Associate Prof., Head of the Department of Pharmacology, Clinical Pharmacology, Omsk State Medical University (Omsk)

*Shertaeva K.D.*, Dr. Sci. (Pharm.), Prof., Head of the Department of Organization and Management of Pharmaceutical Affairs, South Kazakhstan Medical Academy (Kazakhstan, Shymkent)

## СОДЕРЖАНИЕ

### ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Деев Д.А., Пинхасов Б.Б., Лутов Ю.В., Селятицкая В.Г.** Анализ факторов, ассоциированных с тяжестью течения новой коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2 . . . . . 7
- Морозов В.Н.** Изменения морфометрических параметров периферических эндокринных желез и показателей микроструктуры, фазового состава биоминерала регенерата большеберцовых костей после длительного воздействия бензоата натрия . . . . . 19
- Мершалова А.А., Бородина Г.Н., Литвинова Т.А., Елясин П.А.** Кефалометрические показатели подростков и юношей Алтайского края с учетом двигательной активности и соматотипа . . . . . 37
- Швецова А.М., Королев М.А., Чуринов А.А., Бондаренко Н.А., Бгатова Н.П., Ершов К.И., Мадонов П.Г., Равилова Ю.Р., Мишенкина С.В.** Ультроструктурная оценка гепатотоксических эффектов пегилированной гиалуронидазы в экспериментах *in vitro* . . . . . 51
- Кошлич К.А., Надеев А.П., Мадонов П.Г., Ершов К.И., Агеева Т.А., Чернова Т.Г., Бакуменко З.В.** Морфологическое исследование экспрессии эстрогена и прогестерона в миометрии мышей во время беременности и позднем послеродовом периоде при остром токсическом гепатозе и в условиях коррекции иммобилизированной гиалуронидазой. . . . . 62
- Поздняков Д.И., Вихорь А.А.** Антиапоптотическое действие триметокси-замещенных монокарбонильных аналогов куркумина в условиях экспериментальной болезни Альцгеймера. . . . . 77
- Савченко С.В., Ламанов А.Н., Айзикович Б.И., Грицингер В.А., Бгатова Н.П., Таскаева Ю.С., Позднякова Л.Л., Шишкова О.М., Ульянова Я.С., Филина Е.И.** Структурная реорганизация миокарда при COVID-19 . . . . . 91
- Абрамкин Э.Э., Макаров И.Ю., Меньщикова Н.В., Абрамкина А.А., Надеев А.П., Логинова А.Б.** Морфофункциональное состояние эндокринного аппарата семенников крыс после перенесенной противоопухолевой химиотерапии . . . . . 102
- Величко В.В., Круглов Д.С., Олешко Е.Д.** Фармакогностическое исследование и диагностические признаки травы оносмы простейшей. . . . . 115
- Шатунова Е.П., Степанова Ю.В., Слатова Л.Н.** Динамика маркеров воспалительного ответа при комплексном лечении хронического сальпингоофорита . . . . . 127

### ОБЗОР

- Юшина Е.С., Зонова Е.В.** Поздняя стадия аксиального спондилоартрита: отсроченная диагностика и выявление потенциальных предикторов прогрессирования заболевания . . . . . 136

---

## CONTENTS

---

### ORIGINAL RESEARCHES

---

- Deev D.A., Pinkhasov B.B., Lutov Y.V., Selyatitskaya V.G.** An analysis of factors associated with the severity of the novel coronavirus infection caused by SARS-CoV-2 . . . . . 7
- Morozov V.N.** Changes in the morphometric parameters of the peripheral endocrine glands and microstructure indicators, phase composition of the biomineral of the regenerating tibias after long-term exposure to sodium benzoate . . . . . 19
- Mershalova A.A., Borodina G.N., Litvinova T.A., Elyasin P.A.** Cephalometric parameters of adolescents and young men of the Altai territory taking into account their physical activity and somatotype . . . . . 37
- Shvetsova A.M., Korolev M.A., Churin A.A., Bondarenko N.A., Bgatova N.P., Ershov K.I., Madonov P.G., Ravilova Yu.R., Mishenina S.V.** Ultrastructural evaluation of hepatotoxic effects of PEGylated hyaluronidase *in vitro*. . . . . 51
- Koshlich K.A., Nadeev A.P., Madonov P.G., Ershov K.I., Ageeva T.A., Chernova T.G., Bakumenko Z.V.** Morphological study of estrogen and progesterone expression in the myometrium of mice during pregnancy and the late postpartum period in acute toxic hepatitis and its correction with immobilized hyaluronidase . . . . . 62
- Pozdnyakov D.I., Vikhor A.A.** Anti-apoptotic effects of trimethoxy-substituted monocarbonyl curcumin analogues in experimental Alzheimer's disease. . . . . 77
- Savchenko S.V., Lamanov A.N., Aizikovich B.I., Gritsinger V.A., Bgatova N.P., Taskaeva Yu.S., Pozdnyakova L.L., Shishkova O.M., Ulyanova Ya.S., Filina E.I.** Structural reorganization of the myocardium in COVID-19 . . . . . 91
- Abramkin E.E., Makarov I.Yu., Menshchikova N.V., Abramkina A.A., Nadeev A.P., Loginova A.B.** Morphofunctional state of the endocrine apparatus of rat testicles after anti-tumor chemotherapy . . . . . 102
- Velichko V.V., Kruglov D.S., Oleshko E.D.** A pharmacognostic study and diagnostic signs of *Onosma simplicissima* herb . . . . . 115
- Shatunova E.P., Stepanova Yu.V., Slatova L.N.** Dynamics of inflammatory response markers in comprehensive treatment of chronic salpingo-oophoritis . . . . . 127

---

### REVIEW

---

- Yushina E.S., Zonova E.V.** Advanced axial spondyloarthritis: delayed diagnosis and identification of potential predictors of disease progression. . . . . 136

## Анализ факторов, ассоциированных с тяжестью течения новой коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2

Д.А. Деев<sup>1,2</sup>, Б.Б. Пинхасов<sup>2,3</sup>, Ю.В. Лутов<sup>2</sup>, В.Г. Селятицкая<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

<sup>2</sup>ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», Новосибирск, Россия

<sup>3</sup>ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия

### АННОТАЦИЯ

**В в е д е н и е .** Из клинических наблюдений следует, что наиболее тяжелое течение новой коронавирусной инфекции (НКИ), вызванной SARS-CoV-2, наблюдается у лиц с ожирением и ассоциированными с ним метаболическими и сердечно-сосудистыми заболеваниями, при этом у пациентов старшей возрастной группы, имеющих коморбидную патологию, заболевание протекает в еще более тяжелой форме.

**Ц е л ь .** Изучить ассоциацию антропометрических и клинико-лабораторных показателей, характеризующих ожирение, с особенностями течения НКИ для выявления наиболее чувствительных маркеров тяжести заболевания.

**М а т е р и а л ы и м е т о д ы .** В исследование включены 172 пациента (мужчины и женщины в возрасте от 33 до 86 лет (средний возраст  $62.2 \pm 12.1$  года)), находившихся на стационарном лечении с НКИ в инфекционном госпитале в 2020–2021 гг. Больные были разделены на две группы: группа 1 – пациенты со средней степенью тяжести ( $n = 127$ ), а группа 2 – больные с тяжелым течением заболевания ( $n = 45$ ). Пациентов с легким течением среди госпитализированных не было. Всем пациентам проведены клиническое обследование, антропометрия, лабораторное и инструментальное исследования, в том числе эхокардиографическая оценка структурно-функциональных параметров сердца с определением толщины эпикардального жира (ТЭЖ).

**Р е з у л ь т а т ы .** У пациентов с тяжелым течением НКИ индекс коморбидности CIRS-G был достоверно выше, чем у пациентов со средней степенью тяжести ( $p < 0.05$ ). Пациенты с тяжелым течением НКИ также имели более выраженное висцеральное ожирение, о чем свидетельствовали статистически более выраженные значения таких показателей, как объем талии (ОТ), отношение объем талии/объем бедер (ОБ) и ТЭЖ.

Для выявления факторов, ассоциированных с тяжестью течения НКИ, был проведен корреляционный анализ. Выявлен ряд статистически значимых корреляционных связей (положительных и отрицательных) между ключевыми показателями, характеризующими тяжесть НКИ, и факторами, влияющими на них. Самое большое количество корреляционных связей было с показателем ТЭЖ, имеющим статистически значимую прямую корреляционную связь с длительностью госпитализации, уровнем С-реактивного белка, фибриногена, а также с объемом поражения легких. Отрицательная корреляционная связь была выявлена с уровнем сатурации, общего белка и альбумина. Количество корреляционных связей с ТЭЖ практически в 2 раза превышало другие показатели, и уровень силы связей был выше. За ТЭЖ далее следовали ОТ и отношение ОТ/ОБ. На третьем месте расположился индекс коморбидности CIRS-G.

**З а к л ю ч е н и е .** Наличие висцерального ожирения является предиктором длительности госпитализации пациента и характера течения НКИ, а ТЭЖ оказалась наиболее чувствительным маркером тяжести течения инфекционного заболевания.

**Ключевые слова:** новая коронавирусная инфекция, ожирение, толщина эпикардального жира.

**Образец цитирования:** Деев Д.А., Пинхасов Б.Б., Лутов Ю.В., Селятицкая В.Г. Анализ факторов, ассоциированных с тяжестью течения новой коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2 // Journal of Siberian Medical Sciences. 2024;8(3):7-18. DOI: 10.31549/2542-1174-2024-8-3-7-18

Поступила в редакцию 01.04.2024  
Прошла рецензирование 15.04.2024  
Принята к публикации 29.04.2024

Автор, ответственный за переписку  
Деев Денис Андреевич: ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины». 6301117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2.  
E-mail: deevdmd@gmail.com

Received 01.04.2024  
Revised 15.04.2024  
Accepted 29.04.2024

Corresponding author  
Denis A. Deev: Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, 2, Timakova str., Novosibirsk, 6301117, Russia.  
E-mail: deevdmd@gmail.com

## An analysis of factors associated with the severity of the novel coronavirus infection caused by SARS-CoV-2

D.A. Deev<sup>1,2</sup>, B.B. Pinkhasov<sup>2,3</sup>, Y.V. Lutov<sup>3</sup>, V.G. Selyatitskaya<sup>3</sup>

<sup>1</sup>*Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia*

<sup>2</sup>*Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russia*

<sup>3</sup>*Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia*

### ABSTRACT

**I n t r o d u c t i o n .** Data from clinical studies indicate that the most severe course of the novel coronavirus infection (NCI) caused by the SARS-CoV-2 virus is observed in people with obesity and associated metabolic and cardiovascular diseases, then, in elderly patients with comorbidities, the disease proceeds in an even more severe form.

**A i m .** To study the association of anthropometric and clinical laboratory parameters characterizing obesity with the course of the NCI in order to identify the most sensitive markers of the disease severity.

**M a t e r i a l s a n d m e t h o d .** 172 patients (men and women) aged from 33 to 86 years (mean age  $62.2 \pm 12.1$  year) who were under inpatient treatment for the NCI in an infectious hospital during 2020–2021 were examined. The patients were divided into two groups: group 1, patients with the moderate course of the NCI ( $n = 127$ ), and group 2, patients – with the severe ( $n = 45$ ). There were no patients with the mild course of the NCI among those hospitalized. All patients underwent anthropometric, laboratory and clinical examinations, including echocardiographic assessment of the structural and functional parameters of the heart with the epicardial fat thickness (EFT) assessment.

**R e s u l t s .** In patients with severe NCI, the Cumulative Illness Rating Scale for Geriatrics (CIRS-G) score was significantly higher than in patients with moderate NCI ( $p < 0.05$ ). Patients with the severe NCI also had more pronounced visceral obesity, as evidenced by statistically much higher values of such indicators as waist circumference (WC), the waist and hip circumference (WC/HC) ratio and EFT. A correlation analysis was performed to identify factors associated with the severity of the NCI. A number of statistically significant correlations (positive and negative) were identified between key indicators characterizing the severity of NCI and the factors affecting them. The largest number of correlations was identified with the EFT, which had a statistically significant direct correlation with the duration of hospitalization, levels of C-reactive protein, fibrinogen, as well as the volume of lung damage. A negative correlation was found with the levels of saturation, total protein and albumin. The number of correlations with EFT was almost 2 times higher than with other indicators, and the correlation strength was higher. EFT was followed by WC and the WC/HC ratio. In third place was the CIRS-G score.

**C o n c l u s i o n .** Visceral obesity is a predictor of the hospitalization duration and the NCI progression, and the EFT turned out to be the most sensitive marker of the severity of the studied infectious disease.

**Keywords:** novel coronavirus infection, obesity, epicardial fat thickness.

**Citation example:** Deev D.A., Pinkhasov B.B., Lutov Y.V., Selyatitskaya V.G. An analysis of factors associated with the severity of the novel coronavirus infection caused by SARS-CoV-2. *Journal of Siberian Medical Sciences*. 2024;8(3):7-18. DOI: 10.31549/2542-1174-2024-8-3-7-18

### ВВЕДЕНИЕ

Новая коронавирусная инфекция (НКИ), вызванная коронавирусом 2-го типа, который ответственен за тяжелый острый респираторный синдром (SARS-CoV-2), является опасным инфекционным заболеванием, поражающим не только органы системы дыхания, но и сердечно-сосудистой, эндокринной, пищеварительной и других систем, нередко приводящим к летальному исходу. Одним из ключевых и критических механизмов патогенеза НКИ является развитие так называемого цитокинового шторма, являющегося гиперэргической реакцией иммунной

### INTRODUCTION

The novel coronavirus infection (NCI) caused by the coronavirus 2 (SARS-CoV-2), responsible for the severe acute respiratory syndrome, is a dangerous infectious disease involving organs of both cardiovascular system and endocrine, digestive and other systems, and often leading to the fatal outcome. One of the key and critical pathogenic mechanisms of the NCI is the development of the cytokine storm, a hyperergic immune response to the entry of an organism by a dangerous pathogen, which involves the cytokine overexpression by activated immune cells [1, 2]. Such an excessive immune response ini-

системы человека на внедрение опасного инфекционного агента в организм, которая заключается в избыточной выработке активированными клетками иммунной системы цитокинов [1, 2]. Такая чрезмерная реакция иммунной системы, исходно имеющая защитную функцию, способна вызывать генерализованное гипервоспалительное состояние организма, повреждающее собственные клетки и ткани [1, 3], наиболее яркое его проявление – острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС).

По данным литературы наиболее тяжелое течение НКИ наблюдается у лиц с ожирением, СД типа 2 и заболеваниями сердечно-сосудистой системы, часто приводя к развитию осложнений, таких как инфаркт миокарда, острое нарушение мозгового кровообращения и другие, замыкая тем самым порочный круг [2]. У пациентов старшей возрастной группы, имеющих коморбидную патологию, заболевание протекает в еще более тяжелой форме.

Известно, что с возрастом в организме увеличивается количество жировой ткани (ЖТ), с характерным ее накоплением в абдоминальных жировых депо. Абдоминальный тип ожирения характеризуется накоплением висцеральной ЖТ, клетки которой секретируют целый ряд адипокинов. Кроме того, в висцеральной ЖТ выявляют большое количество макрофагов и других клеток иммунной системы, секретирующих цитокины, которые участвуют в поддержании системного вялотекущего хронического воспаления [4]. Можно предположить, что висцеральная ЖТ, являющаяся источником провоспалительных цитокинов, способна потенцировать развитие цитокинового шторма и утяжелять, таким образом, течение заболевания.

## ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучить ассоциацию антропометрических и клинико-лабораторных показателей, характеризующих ожирение, с особенностями течения новой коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2, для выявления наиболее чувствительных маркеров тяжести заболевания.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании приняли участие 172 пациента (мужчины и женщины), находившихся на стационарном лечении в инфекционном госпитале Новосибирской клинической районной больницы № 1 (НКРБ № 1). В исследование включены пациенты в возрасте от 33 до 86 лет (средний возраст  $62.2 \pm 12.1$  года), госпитализирован-

но, имея защитную функцию, может вызвать системное гипервоспалительное состояние, влияющее на клетки и ткани организма [1, 3]. Наиболее striking sign of that excessive inflammation is the acute respiratory distress syndrome (ARDS).

According to the literature data, the most severe disease is observed in patients with obesity, type 2 diabetes mellitus, cardiovascular diseases, often causing complications, such as myocardial infarction, acute cerebrovascular event, etc. and completing a vicious circle [2]. In elderly patients with comorbidities, the disease takes a more severe course.

It is known that the volume of adipose tissue (AT) with age increases, with a specific tendency to accumulate in abdominal fat depots. The abdominal type of obesity is characterized by the accumulation of visceral AT whose cells secrete a number of adipokines. Besides, in visceral adipose tissue, a lot of macrophages and other cytokine-releasing immune cells are revealed that participate in maintaining the systemic low-grade inflammation [4]. It is suggested that visceral adipose tissue being a source of anti-inflammatory cytokines, can initiate the cytokine storm development, and, as a result, aggravate the course of the disease.

## AIM OF THE RESEARCH

To study the association of anthropometric and clinical laboratory parameters characterizing obesity with the course of the NCI in order to identify the most sensitive markers of the disease severity.

## MATERIALS AND METHODS

We have recruited for the study 172 patients (men and women) that were under inpatient treatment in the Infectious Department of Novosibirsk Clinical Regional Hospital No. 1 (NCRH No. 1). Patients aged from 33 to 86 years (mean age  $62.2 \pm 12.1$  year) hospitalized with the diagnosis of NCI were included into the study. The NCI diagnosis was made according to the positive testing for SARS-CoV-2 RNA by polymerase chain reaction. The inclusion criterion was the period of up to 10 days since the onset of the disease. The exclusion criterion was the presence of a severe concomitant disease decompensation. The severity of NCI, as well as the regimen of treatment were determined according to the Interim Guidelines for Prevention, Diagnosis and Treatment of a Novel Coronavirus Infection, version 9 26.10.2020 which were in force at that time.

Based on criteria from the Guidelines, the participants of the study were divided into two groups: group 1, patients with the moderate NCI ( $n = 127$ ), and group 2, patients with the severe NCI ( $n = 45$ ).

ные с диагнозом НКИ. Диагноз НКИ был установлен на основании положительного ПЦР-теста на определение РНК SARS-CoV-2. Критерием включения пациентов в исследование был срок не более 10 сут от появления симптомов заболевания. Критерием исключения пациентов из исследования было наличие тяжелой сопутствующей патологии в стадии декомпенсации. Степень тяжести течения НКИ у пациентов, а также объем проводимой терапии определяли в соответствии с действующими на тот момент «Временными методическими рекомендациями. Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)», версия 9 (26.10.2020).

На основании данных критериев участники исследования были разделены на две группы: группа 1 – пациенты со средней степенью тяжести ( $n = 127$ ), а группа 2 – пациенты с тяжелым течением заболевания ( $n = 45$ ). Пациентов с легким течением среди госпитализированных не было. Пациенты были отобраны методом случайной последовательной выборки в течение 2020–2021 гг.

Всем пациентам проведены: клиническое обследование, антропометрия, лабораторное и инструментальное исследования. Антропометрия включала измерение роста, массы тела, объема бедер (ОБ) и объема талии (ОТ); также рассчитывался индекс массы тела (ИМТ):  $ИМТ = m/h^2$ , где  $m$  – масса тела, кг;  $h$  – рост, м. Лабораторное исследование включало общий анализ крови и биохимический анализ (уровни аланиновой и аспарагиновой аминотрансфераз (АЛТ, АСТ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), глюкозы, триглицеридов (ТГ), общего холестерина (ХС), ХС липопротеидов высокой и низкой плотности (ЛПВП, ЛПНП), С-реактивного белка (СРБ), фибриногена, общего белка, альбумина, креатинина; определяли скорость клубочковой фильтрации (СКФ)). Инструментальное исследование включало рентгенографию органов грудной клетки, эхокардиографическую оценку структурно-функциональных параметров сердца с определением толщины эпикардального жира (ТЭЖ) из стандартной левой парастеральной позиции на аппарате GE Vivid E9 (General Electric, США) с использованием матричного секторного датчика M5S (1.5–4.6 МГц).

Клиническое обследование включало сбор анамнеза, изучение амбулаторных карт и историй болезни, анализ наличия и выраженности сопутствующих патологических состояний, расчет индекса коморбидности для пожилой попу-

There were no patients with the mild NCI course among those patients. Patients were selected using random sequential sampling for 2020–2021.

All of them underwent anthropometric, laboratory and clinical examinations. Anthropometry included the measurement of height, body weight, waist circumference (WC), hip circumference (HC), as well as body mass index (BMI) ( $BMI = m/h^2$ , where  $m$  – body weight, kg;  $h$  – height, m) was calculated. Laboratory examination included complete blood count and biochemistry (alanine aminotransferase (ALT), asparagine aminotransferase (AST), lactate dehydrogenase (LDG), glucose, triglycerides (TGs), total cholesterol (Ch), high-density lipoprotein (HDL) and low-density lipoprotein (LDL) cholesterol, C-reactive protein (CRP), fibrinogen, total protein, albumin, creatinine, glomerular filtration rate (GFT)). Clinical investigation included chest x-ray, echocardiographic assessment of the structural and functional parameters of the heart with determination of epicardial fat thickness (EFT) from the standard left parasternal position using a GE Vivid E9 (General Electric, USA) ultrasound machine with matrix array sector transducer probe M5S (1.5–4.6 MHz).

Clinical examination included the interview, study of the outpatient records and medical histories, analysis of the presence and severity of concomitant pathological conditions, calculation of the comorbidity index for the elderly population CIRS-G (Cumulative Illness Rating Scale for Geriatrics). During the whole period of hospitalization in the NCRH No. 1, the body temperature, pulse rate, blood pressure, saturation level were measured in all patients. Patients were treated accordance with the Interim Guidelines.

Statistical processing of the data was carried out using basic package of STATISTICA 10.0 (StatSoft Inc., USA) software. Because the distribution of the sample's variables assessed by the Kolmogorov-Smirnov test differed from normal, the statistical significance of differences was determined using the Pearson's  $\chi^2$  test for qualitative variables. To check the equality of some sample's medians, the Kruskal-Wallis  $H$  test was used. For determining the linear relationship between two variables, the Spearman's rank correlation ( $r$ ) was performed. Probability of the truth of a null hypothesis was accepted at statistical significance of 5% ( $p < 0.05$ ).

## RESULTS

There were no significant differences between the groups studied by age and gender characteristics. Patients with severe NCI had much higher statistical significance of CIRS-G score. An analysis of the basic

ляции CIRS-G (Cumulative Illness Rating Scale for Geriatrics). В течение всего периода госпитализации в НКРБ № 1 у всех пациентов, участвующих в исследовании, измеряли температуру тела, частоту пульса, артериальное давление, уровень сатурации. Лечение проводили в соответствии с общепринятыми рекомендациями.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью базового пакета программ STATISTICA 10.0 (StatSoft Inc., США). Поскольку распределение анализируемых показателей в выборке, оцененное при помощи теста Колмогорова – Смирнова, отличалось от нормального, статистическую значимость отличий оценивали с использованием критерия  $\chi^2$  Пирсона для качественных признаков. При проверке равенства медиан нескольких выборок использовался *H* критерий Краскела – Уоллиса. Для определения линейной связи между двумя величинами проводили корреляционный анализ Спирмена (*r*). Вероятность справедливости нулевой гипотезы (*p*) принимали при 5% уровне значимости ( $p < 0.05$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По половозрастным показателям анализируемые группы пациентов статистически значимо не различались. Пациенты с тяжелой степенью НКИ имели статистически более выраженный индекс коморбидности CIRS-G (табл. 1). Анализ основных клинико-лабораторных показателей и антропометрических данных показал, что у пациентов 1-й и 2-й групп количество эритроцитов и уровень гемоглобина находились в пределах нормативных значений, при этом данные показатели были выше в группе 2. Несмотря на выраженный воспалительный процесс, среднее количество лейкоцитов находилось ближе к верхней границе референсных значений и группы по данному показателю также не различались. Уровень скорости оседания эритроцитов существенно превышал референсные значения, но в группах статистически значимых различий выявлено не было.

Анализ биохимических показателей выявил статистически значимые межгрупповые различия по следующим показателям: уровень глюкозы, СРБ, фибриногена, которые были выше в группе пациентов с тяжелым течением НКИ, а уровень общего белка и альбумина оказался достоверно ниже. Кроме того, пациенты из группы 2 имели статистически значимо меньший уровень сатурации крови кислородом и существенно большую площадь поражения легочной ткани.

clinical laboratory parameters and anthropometric data showed that in patients of groups 1 and 2, the red blood cell count and hemoglobin level were in the reference range, with these parameters being higher in group 2. Despite the pronounced inflammation, the mean white blood cell count was close to the upper limit of the reference range, and groups did not differ by this parameter. The erythrocyte sedimentation rate level exceeded substantially the reference range, but significant differences in the compared groups were not found.

An analysis of biochemistry parameters revealed significant differences between groups in the following indicators: levels of glucose, CRP, fibrinogen were higher in group with severe NCI, while the levels of total protein and albumin were significantly lower. Additionally, group 2 patients had significantly lower oxygen saturation of blood and the larger area of the lung tissue damage.

An analysis of anthropometric parameters characterizing the volume and topography of adipose tissue showed that the group 2 patients had higher indicators, such as body weight, BMI, WC and the WC/HC ratio. It is known that WC and the WC/HC ratio are quite frequently used by clinicians as abdominal obesity markers and characterize the volume of visceral fat depots. Since the WC and the WC/HC ratio are indirect markers of adipose tissue volume, in parallel, we analyzed EFT – its values were significantly higher in group 2. The results indicate the volume and, particularly, the metabolic activity of visceral fat affect significantly the severity of the NCI course.

Since the CIRS-G score statistically significantly differed between the groups, we have analyzed the somatic morbidity patterns in patients of studied groups. An analysis of medical histories showed that body weight of the majority of patients (143 (83.2%)) exceeded the reference values: overweight – 60 (34.9 %) patients and obesity – 83 (48.3%). Cardiovascular diseases prevailed in the structure of the somatic pathology was diagnosed in 129 (75.5%) patients. Among certain cardiovascular nosologies, arterial hypertension (AH) was the most common – 127 (73.8 %) patients; coronary artery disease (CAD) was found in 47 (27.3%) patients, of whom 13 (27.6%) had history of myocardial infarction (MI); chronic heart failure (CHF) – in 28 (16.3 %) patients (Fig. 1). Endocrine diseases were diagnosed in 55 (32.0%) patients. The most common endocrine pathology was type 2 diabetes mellitus (DM) – in 50 (29.0%) patients. Thyroid disease (autoimmune thyroiditis, diffuse nodular toxic goiter, etc.) were found sporadically. Less common were respiratory

**Таблица 1.** Анализ клинико-лабораторных показателей у мужчин и женщин в группах исследования (M ± SD)  
**Table 1.** The analysis of clinical laboratory parameters in male and female patients of studied groups (M ± SD)

| Показатель<br>Parameter   | Группа 1, средняя<br>степень тяжести<br>Group 1, moderate NCI<br>(n = 127) | Группа 2, тяжелая<br>степень тяжести<br>Group 2, severe NCI<br>(n = 45) | p                |
|---|--|---|------------------|
| Мужчины/ женщины<br>Male/ female  | 56/71  | 20/25   | >0.05            |
| Длительность госпитализации, дней<br>Duration of hospitalization, days  | 16.1 ± 6.8   | 21.2 ± 6.6  | <b>&lt;0.001</b> |
| CIRS-G, баллы<br>CIRS-G score   | 1.5 ± 0.9  | 1.7 ± 0.9   | <b>&lt;0.05</b>  |
| Возраст, лет<br>Age, years  | 62.0 ± 12.9  | 63.6 ± 9.2  | >0.425           |
| Эритроциты, 10 <sup>12</sup> /л<br>Red blood cells, 10 <sup>12</sup> /l   | 4.5 ± 0.6  | 4.8 ± 0.7   | <b>&lt;0.01</b>  |
| Гемоглобин, г/л<br>Hemoglobin, g/l  | 131.2 ± 15.1   | 135.7 ± 15.8  | >0.05            |
| Тромбоциты, 10 <sup>3</sup> клеток/мкл<br>Platelets, 10 <sup>3</sup> cells/ $\mu$ l                                   | 250.6 ± 101.3  | 246.4 ± 95.3  | >0.05            |
| Лейкоциты, 10 <sup>9</sup> /л<br>White blood cells, 10 <sup>9</sup> /l  | 7.9 ± 3.1  | 7.0 ± 2.6   | >0.05            |
| Скорость оседания эритроцитов, мм/ч<br>Erythrocyte sedimentation rate, mm/h   | 23.6 ± 16.4  | 28.4 ± 19.5   | >0.05            |
| Глюкоза, ммоль/л<br>Glucose, mmol/l   | 7.5 ± 3.4  | 9.1 ± 4.8   | <b>&lt;0.05</b>  |
| Креатинин, мкмоль/л<br>Creatinine, $\mu$ mol/l  | 83.9 ± 26.5  | 92.6 ± 23.3   | >0.05            |
| Скорость клубочковой фильтрации, мл/мин/1.73 м <sup>2</sup><br>Glomerular filtration rate, ml/min/1.73 m <sup>2</sup> | 77.2 ± 20.8  | 68.9 ± 18.7   | <b>&lt;0.05</b>  |
| Креатинкиназа, Ед/л<br>Creatine kinase, U/l   | 145.6 ± 125.3  | 182.7 ± 211.2   | >0.05            |
| С-реактивный белок, мг/л<br>C-reactive protein, mg/l  | 37.6 ± 41.3  | 128.3 ± 62.2  | <b>&lt;0.001</b> |
| Белок, г/л<br>Protein, g/l  | 70.3 ± 6.6   | 66.9 ± 6.0  | <b>&lt;0.01</b>  |
| Альбумин, г/л<br>Albumin, g/l   | 38.7 ± 4.2   | 34.7 ± 4.7  | <b>&lt;0.001</b> |
| Фибриноген, г/л<br>Fibrinogen, g/l  | 4.4 ± 1.0  | 5.1 ± 1.2   | <b>&lt;0.01</b>  |
| Сатурация, %<br>Saturation, %   | 96.9 ± 1.9   | 85.9 ± 3.6  | <b>&lt;0.001</b> |
| Систолическое артериальное давление, мм рт. ст.<br>Systolic blood pressure, mm Hg                                     | 130.5 ± 14.9   | 129.8 ± 11.5  | >0.05            |
| Диастолическое артериальное давление, мм рт. ст.<br>Diastolic blood pressure, mm Hg                                   | 82.3 ± 7.9   | 85.0 ± 8.5  | >0.05            |
| Индекс массы тела, кг/м <sup>2</sup><br>Body mass index, kg/m <sup>2</sup>  | 29.9 ± 6.0   | 32.5 ± 6.8  | <b>&lt;0.05</b>  |
| Обхват талии, см<br>Waist circumference, cm   | 100.2 ± 14.0   | 106.7 ± 13.8  | <b>&lt;0.01</b>  |
| Обхват бедер, см<br>Hip circumference, cm   | 98.2 ± 9.6   | 100.8 ± 12.1  | >0.05            |
| Отношение обхват талии / обхват бедер<br>Waist and hip circumference ratio  | 1.02 ± 0.11  | 1.06 ± 0.11   | <b>&lt;0.01</b>  |
| Толщина эпикардального жира, мм<br>Epicardial fat thickness, mm   | 4.8 ± 2.1  | 6.9 ± 3.0   | <b>&lt;0.01</b>  |

П р и м е ч а н и е. НКИ – новая коронавирусная инфекция; CIRS-G – Cumulative Illness Rating Scale for Geriatrics (кумулятивный индекс коморбидности для пожилой популяции).

N o t e. NCI – novel coronavirus infection; CIRS-G – Cumulative Illness Rating Scale for Geriatrics.

Анализ антропометрических показателей, характеризующих выраженность и топографию жировой ткани, показал, что пациенты из группы 2 имели более высокие показатели: массы тела, ИМТ, ОТ и отношения ОТ/ОБ. Известно, что ОТ и отношение ОТ/ОБ наиболее часто используются клиницистами в качестве маркеров абдоминального ожирения и характеризуют выраженность висцеральных жировых депо. Но так как показатели ОТ и ОТ/ОБ являются косвенными маркерами количества висцеральной жировой ткани, параллельно была проанализирована ТЭЖ – значения данного показателя были статистически значимо выше в группе 2. Полученные результаты свидетельствуют о том, что количество и особенно метаболическая активность висцерального жира существенно влияют на тяжесть течения НКИ.

Так как индекс коморбидности CIRS-G статистически значимо различался в группах, был проведен анализ структуры соматической патологии у пациентов исследуемых групп. Анализ историй болезни показал, что у большинства пациентов – 143 (83.2 %) масса тела была выше нормативных значений: избыточная масса тела – у 60 (34.9 %) и ожирение – у 83 (48.3 %). В структуре соматической патологии доминировали заболевания сердечно-сосудистой системы (ССС), которые были выявлены у 129 чел. (75.0 %). Среди отдельных нозологий сердечно-сосудистой патологии (ССП) наиболее часто встречались гипертоническая болезнь (ГБ) – у 127 (73.8 %) чел.; ишемическая болезнь сердца (ИБС) – у 47 (27.3 %) пациентов, 13 (27.6 %) из которых перенесли инфаркт миокарда (ИМ); хроническая сердечная недостаточность – у 28 (16.3 %) обследуемых (рис. 1). У 55 (32.0 %) пациентов выявлены заболевания эндокринной системы. Наиболее часто встречающимся заболеванием был СД типа 2 – у 50 (29.0 %) обследуемых. Заболевания щитовидной железы (аутоиммунный тиреоидит, диффузно-узловой токсический зоб и др.) были выявлены в единичных случаях. Реже встречались заболевания дыхательной системы: у 8.1 % пациентов была бронхиальная астма и хроническая обструктивная болезнь легких; заболевания желудочно-кишечного тракта: у 4.7 % пациентов выявлена язвенная болезнь желудка и 12-перстной кишки, хронический панкреатит, вирусный гепатит, цирроз печени, хронический холецистит; заболевания мочеполовой системы: у 3.5 % – мочекаменная болезнь (МКБ), пиелонефрит; злокачественные новообразования выявлены у 2.9 % пациентов.

diseases (bronchial asthma and chronic obstructive pulmonary disease) was diagnosed in 81% patients; gastrointestinal diseases (peptic ulcer disease, chronic pancreatitis, viral hepatitis, liver cirrhosis, chronic cholecystitis) – in 4.7%; urinary tract diseases (nephrolithiasis, pyelonephritis) – in 3.5%; malignant neoplasms – in 2.9%.

Among those admitted to hospital for NCI, 32 patients (18.6%) did not seek medical care previously, therefore they were considered apparently healthy people.

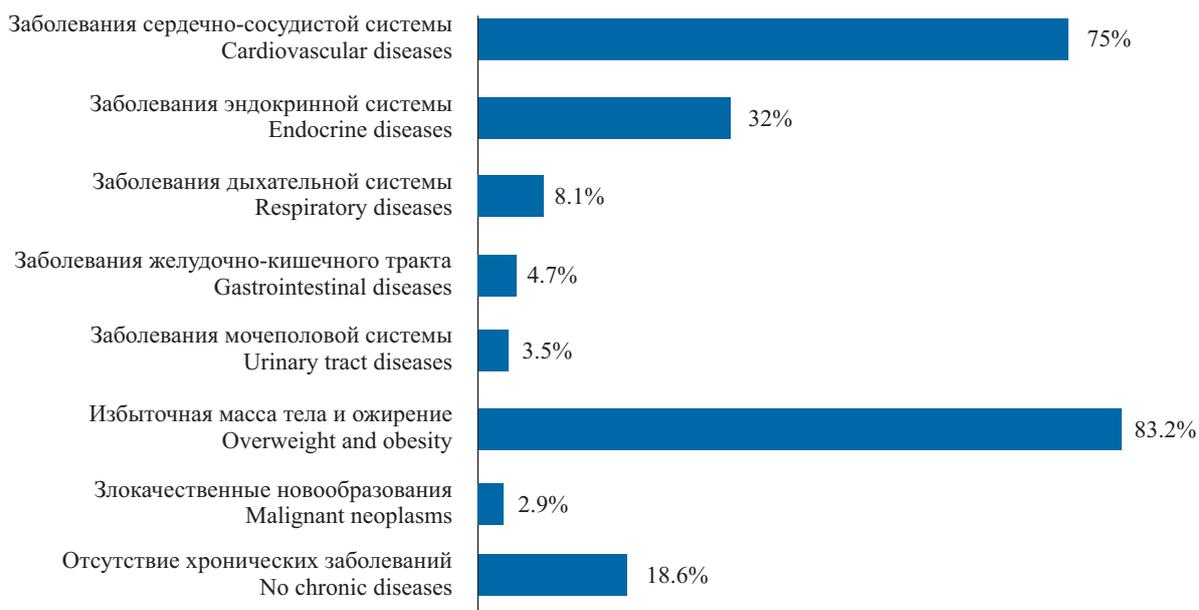
The incidence of certain diseases in groups with various severity of the disease is shown in Fig. 2. As we can see, in group 2, such nosologies as CHF and type 2 DM were found significantly more often compared to group 1 ( $p < 0.05$ ).

To identify factors associated with the severity of the NCI course, correlation analysis was performed (Table 2). A number of statistically significant correlations (positive and negative) between key indicators characterizing severity of the NCI and factors affecting them were revealed. As a result of the analysis, it was established that the maximum number of correlations falls on the EFT indicator. EFT had a statistically significant direct correlation with the duration of hospitalization, levels of CRP, fibrinogen, as well as the volume of the lung tissue damage. A negative correlation with the parameters of saturation, total protein and albumin was found. The number of correlations with the EFT was virtually twofold higher with other parameters, and the strength of correlations was higher. EFT was followed by WC and the WC/HC ratio. CIRS-G score ranked third.

Thus, much higher EFT and intra-abdominal fat area parameters in patients with the severe NCI confirm the excessive accumulation of visceral fat, which is an active endocrine organ and secretes a considerable amount of biologically active substances, potentiating the inflammation caused by the SARS-CoV-2 virus, transferring local inflammation on the systemic level and, thus, aggravating the course of the disease [4].

## DISCUSSION

Given the high probability of a repeat of the 2019 situation of the COVID-19, it is extremely important to search for and analyze factors predetermining the severity of the NCI course. It has been shown that one of such factors is the age of the patient [5]. In our study, the age did not manifest itself, which may be due to the predominant participation of elderly people in the study. Besides, this may be due to the enrollment of patients with moderate and severe course of the NCI.

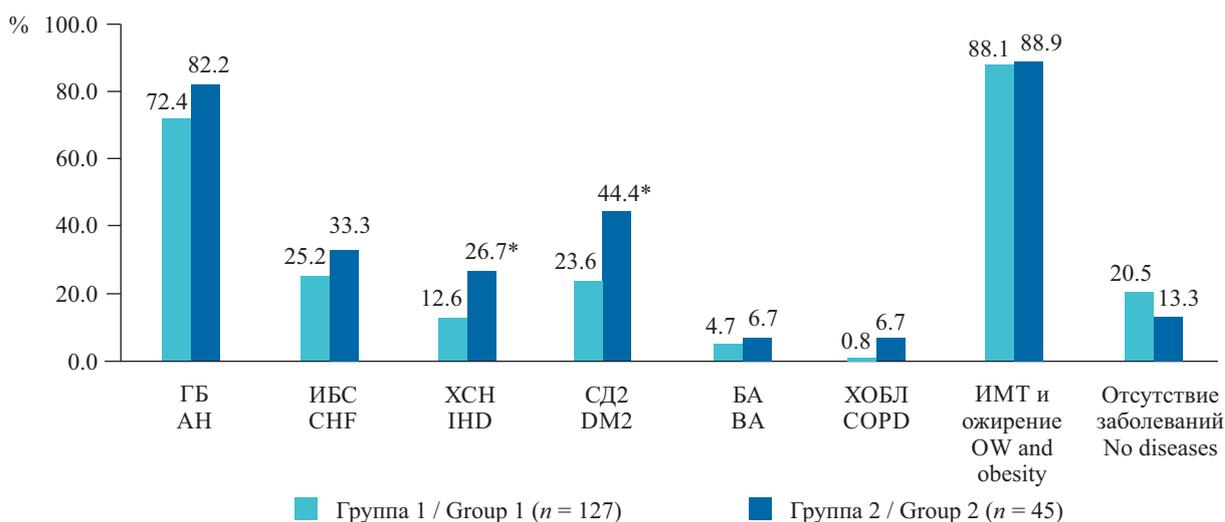


**Рис. 1.** Структура соматической патологии у пациентов с новой коронавирусной инфекцией  
**Fig. 1.** The structure of somatic morbidity in patients with NCI

32 (18.6 %) пациента, госпитализированных с НКИ, никогда ранее не обращались за медицинской помощью, поэтому их условно можно отнести к группе без соматической патологии.

На рис. 2 представлена частота встречаемости отдельных заболеваний в группах пациентов с различной степенью тяжести НКИ. Показано, что в группе 2 такие нозологии, как ХСН и СД

Among other factors, a particular role belongs to the comorbidity and its structure. Our study allowed to assess the structure of somatic pathology in patients with NCI and identify main diseases associated with a more severe course of the disease. In group 1, AH was detected in 72.4% of cases, and in group 2 – in 82.2%. The results of other studies also indicate that AH is the most common in the



**Рис. 2.** Частота встречаемости отдельных видов соматической патологии у пациентов с различной тяжестью течения новой коронавирусной инфекции (ГБ – гипертоническая болезнь; ИБС – ишемическая болезнь сердца; ХСН – хроническая сердечная недостаточность; СД2 – сахарный диабет типа 2; БА – бронхиальная астма; ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких; ИМТ – избыточная масса тела; \*  $p < 0.05$ )  
**Fig. 2.** The incidence of certain types of somatic pathology in patients with different severity of NCI (АН – arterial hypertension; CHF – chronic heart failure; IHD – ischemic heart disease; DM2 – type 2 diabetes mellitus; BA – bronchial asthma; COPD – chronic obstructive pulmonary disease; OW – overweight; \*  $p < 0.05$ )

**Таблица 2.** Корреляционный анализ факторов риска тяжелого течения новой коронавирусной инфекции  
**Table 2.** The correlation analysis of risk factors of the severe NCI

| Фактор риска<br>Risk factors                               | Возраст<br>Age | CIRS-G       | ТЭЖ<br>EFT   | ИМТ<br>BMI   | ОТ<br>WC     | ОБ<br>HC | ОТ/ОБ<br>WC/HC |
|--|----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|----------|----------------|
| Длительность госпитализации<br>Duration of hospitalization | 0.12           | <b>0.17</b>  | <b>0.35</b>  | 0.07         | <b>0.21</b>  | -0.05    | <b>0.30</b>    |
| Уровень сатурации / Saturation<br>СРБ / C-reactive protein | -0.08          | <b>-0.10</b> | <b>-0.36</b> | <b>-0.30</b> | <b>-0.29</b> | -0.06    | <b>-0.25</b>   |
| Белок / Protein  | 0.05           | 0.07         | <b>0.39</b>  | 0.10         | 0.112        | 0.04     | 0.07           |
| Альбумин / Albumin   | -0.02          | <b>-0.2</b>  | <b>-0.36</b> | -0.15        | <b>-0.17</b> | -0.02    | <b>-0.22</b>   |
| Фибриноген / Fibrinogen                                    | -0.10          | -0.14        | <b>-0.23</b> | <b>-0.20</b> | <b>-0.19</b> | -0.03    | <b>-0.19</b>   |
| Сумма факторов / Sum of factors                            | -0.08          | -0.02        | <b>0.26</b>  | -0.13        | -0.102       | -0.16    | -0,03          |
|  | 0              | 3            | <b>6</b>     | 2            | 4            | 0        | 4              |

Примечания: При уровне достоверности  $p < 0.05$ .

CIRS-G – Cumulative Illness Rating Scale for Geriatrics (кумулятивный индекс коморбидности для пожилой популяции); ТЭЖ – толщина эпикардального жира; ИМТ – индекс массы тела; ОТ – окружность талии; ОБ – окружность бедер.

Notes: At significance level  $p < 0.05$ .

CIRS-G – Cumulative Illness Rating Scale for Geriatrics; EFT – epicardial fat thickness; BMI – body mass index; WC – waist circumference; HC – hip circumference.

типа 2, встречались достоверно чаще, чем в группе 1 ( $p < 0.05$ ).

Для выявления факторов, ассоциированных с тяжестью течения НКИ, был проведен корреляционный анализ (табл. 2). Выявлен ряд статистически значимых корреляционных связей (положительных и отрицательных) между ключевыми показателями, характеризующими тяжесть НКИ, и факторами, влияющими на них. В результате проведенного анализа установлено, что самое большое количество корреляционных связей было с показателем ТЭЖ. ТЭЖ имела статистически значимую прямую корреляционную связь с длительностью госпитализации, уровнем СРБ, фибриногена, а также с объемом поражения легких. Отрицательная корреляционная связь была выявлена с уровнем сатурации, общего белка и альбумина. Количество корреляционных связей с ТЭЖ практически в 2 раза превышало другие показатели, и уровень силы связей был выше. За ТЭЖ далее следовали ОТ и отношение ОТ/ОБ. На третьем месте расположился индекс коморбидности CIRS-G.

Таким образом, наличие у пациентов с тяжелым течением НКИ более выраженной ТЭЖ и внутриабдоминальных жировых депо подтверждает избыточное накопление висцерального жира в организме, который является эндокринно-активным органом и секретирует значительное количество биологически активных веществ, потенцируя процесс воспаления, вызванный вирусом SARS-CoV-2, переводя локальное воспаление на системный уровень, тем самым утяжеляя течение заболевания [4].

structure of somatic pathology in patients with the NCI [6]. Such a high prevalence of AH in these patients, perhaps, was associated with age of the admitted patients –  $63 \pm 10.7$  years. Some researchers remark on the possibility of a direct influence of AH on the severity of the NCI [5]. In patients of group 2, CHF was diagnosed, which aggravated the prognosis significantly, and was a risk factor for moderately severe and severe course of the NCI [7, 8].

Besides, our study showed that one third of patients (29%) was diagnosed with type 2 DM. In DM patients, the NCI had more severe course, which is consistent with data of other authors on the presence of the direct relationship between insulin resistance and severity of the NCI [9]. Moreover, in a number of mouse models, an increase in the expression of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) genes under hyperglycemia was shown [10]. Hyperglycemia also promotes ACE receptor glycosylation in the lung tissue, which increases the affinity of the latter to SARS-CoV-2 [11].

Docherty et al. studied 16 749 hospital inpatients with the NCI. It was revealed that obese patients had more severe disease and suffered more frequent fatal complications [12]. In the present study, the analysis of anthropometric parameters allowed to detect overweight and obesity in most patients. It is worth paying attention to the fact that the group 2 patients had more pronounced changes in the parameters characterizing not only the volume, but also the topography of abdominal and ectopic visceral fat depots, EFT in particular. The analysis of visceral obesity markers and other factors that influence the

## ОБСУЖДЕНИЕ

Учитывая высокую вероятность повторения ситуации 2019 г. с COVID-19, крайне важным является поиск и анализ факторов, определяющих тяжесть течения НКИ. Показано, что одним из таких факторов является возраст больного [5]. В проведенном исследовании фактор возраста себя не проявил, что может быть связано с преимущественным участием в исследовании лиц пожилого возраста. Возможно, это обусловлено участием в исследовании только пациентов со средней и тяжелой степенями тяжести НКИ.

Среди других факторов определенная роль принадлежит наличию коморбидности и ее структуре. Проведенное исследование позволило оценить структуру соматической патологии пациентов с НКИ и выявить основные заболевания, наличие которых ассоциировано с более тяжелым течением заболевания. ГБ оказалась наиболее встречающейся патологией среди всех заболеваний. В группе 1 АГ была выявлена в 72.4 % случаев, а в группе 2 – в 82.2 %. Результаты других исследований также указывают на то, что ГБ наиболее часто встречалась в структуре соматической патологии пациентов с НКИ [6]. Такое широкое распространение ГБ среди заболевших может быть непосредственно связано с возрастом госпитализированных пациентов –  $63 \pm 10.7$  года. В ряде работ исследователи также высказываются о возможности прямого влияния АГ на тяжесть коронавирусной инфекции [5]. У пациентов из группы 2 более часто выявляли ХСН, которая значимо ухудшала прогноз в острый период заболевания и являлась фактором риска более тяжелого НКИ. В целом же, согласно литературным данным, ССС являются независимым фактором риска среднетяжелого и тяжелого течения НКИ [7, 8].

Кроме того, в настоящем исследовании было показано, что у трети пациентов (29 %) ранее был диагностирован СД типа 2. У пациентов с данным заболеванием статистически значимо чаще НКИ протекала более тяжело, что согласуется с данными других авторов о наличии прямой связи между инсулинорезистентностью и степенью тяжести НКИ [9]. Кроме того, в ряде экспериментальных исследований на мышах были представлены результаты, свидетельствующие о повышении экспрессии генов рецепторов АПФ2 в условиях гипергликемии [10]. Наличие гипергликемии также активирует процесс гликозилирования рецепторов АПФ2 в ткани легкого, что повышает аффинность к SARS-CoV-2 [11].

NCI severity has shown that EFT had the maximal number of statistically significant correlations with the factors determining NCI severity, particularly with the duration of hospitalization, levels of CRP, fibrinogen, saturation, and the volume of the lung tissue damage. A decrease in saturation amidst an increase in the CRP and substantial damage to the lung tissue, can indicate the development of ARDS in a patient, which is one of the life-threatening complications of the NCI [13].

## CONCLUSION

The degree of visceral obesity is a predictor of the hospitalization duration and the NCI progression, and epicardial fat thickness turned out to be the most sensitive marker of the severity of this infectious disease.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

A. Docherty et. al. проанализировали данные 16 749 пациентов, госпитализированных в Великобританию с диагнозом НКИ. Установлено, что пациенты с ожирением переносили инфекцию тяжелее и у них чаще наблюдались фатальные осложнения [12]. В настоящем исследовании анализ антропометрических показателей позволил выявить у большинства пациентов обеих групп наличие избыточной массы тела или ожирения. Стоит обратить внимание на то, что пациенты группы 2 характеризовались достоверно более выраженными значениями показателей, характеризующих не только количество, но и топографию висцеральных жировых депо, как абдоминальных, так и эктопических, в частности ТЭЖ. Анализ маркеров висцерального ожирения и других факторов, влияющих на степень тяжести течения НКИ, показал, что именно ТЭЖ имела наибольшее число статистически значимых корреляционных связей с показателями, определяющими тяжесть течения заболевания, и особенно с длительностью госпитализации, уровнями СРБ, фибриногена, сатурации и объемом поражения легких. Снижение уровня сатурации на фоне повышения СРБ и большой площади поражения легких может свидетельствовать о развитии у пациента ОРДС, что является одним из критических осложнений НКИ [13].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наличие висцерального ожирения является предиктором длительности госпитализации пациента и характера течения НКИ, а толщина эпикардального жира оказалась наиболее чув-

ствительным маркером тяжести течения инфекционного заболевания.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lamers M.M., Haagmans B.L. SARS-CoV-2 pathogenesis // *Nat. Rev. Microbiol.* 2022;20(5):270-284. DOI: 10.1038/s41579-022-00713-0.
2. Rovito R., Augello M., Ben-Heim A. et al. Hallmarks of severe COVID-19 pathogenesis: a pas de deux between viral and host factors // *Front. Immunol.* 2022;13:912336. DOI: 10.3389/fimmu.2022.912336.
3. Guan W.J., Ni Z.Y., Hu Y. et al. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China // *N. Engl. J. Med.* 2020;382(18):1708-1720. DOI: 10.1056/NEJMoa2002032.
4. Тимофеев Ю.С., Джиоева О.Н., Драпкина О.М. Циркулирующие биологические маркеры ожирения: на пути к системному подходу // *Кардиоваскулярная терапия и профилактика.* 2023;22(4):85-93. DOI: 10.15829/1728-8800-2023-3551.
5. Некаева Е.С., Большакова А.Е., Малышева Е.С. и др. Гендерные особенности течения новой коронавирусной инфекции COVID-19 у лиц зрелого возраста // *Современные технологии в медицине.* 2021;13(4):16-26. DOI: 10.17691/stm2021.13.4.02.
6. Анисенкова А.Ю., Апалько С.В., Асауленко З.П. и др. Основные прогностические факторы риска цитокинового шторма у пациентов с COVID-19 (ретроспективное клиническое исследование) // *Клиническая практика.* 2021;12(1):5-15. DOI: 10.17816/clinpract63552.
7. Huang S., Wang J., Liu F. et al. COVID-19 patients with hypertension have more severe disease: a multi-center retrospective observational study // *Hypertens. Res.* 2020;43(8):824-831. DOI: 10.1038/s41440-020-0485-2.
8. Hamo C.E., Kwak L., Wang D. et al. Heart failure risk associated with severity of modifiable heart failure risk factors: the ARIC study // *J. Am. Heart Assoc.* 2022;11(4):e021583. DOI: 10.1161/JAHA.121.021583.
9. Lima-Martínez M.M., Boada C.C., Madera-Silva M.D. et al. COVID-19 and diabetes: A bidirectional relationship // *Clin. Investig. Arterioscler.* 2021;33(3):151-157. DOI: 10.1016/j.arteri.2020.10.001.
10. Roca-Ho H., Riera M., Palau V. et al. Characterization of ACE and ACE2 expression within different organs of the NOD mouse // *Int. J. Mol. Sci.* 2017;18(3):563. DOI: 10.3390/ijms18030563.
11. Brufsky A. Hyperglycemia, hydroxychloroquine, and the COVID-19 epidemic // *J. Med. Virol.* 2020;92:770-775. DOI: 10.1002/jmv.25887.
12. Docherty A.B., Harrison E.M., Green C.A. et al. Features of 20 133 UK patients in hospital with covid-19 using the ISARIC WHO Clinical Characterisation Protocol: prospective observational cohort study // *BMJ.* 2020;369:m1985. DOI: 10.1136/bmj.m1985.
13. Simonnet A., Chetboun M., Poissy J. et al. High prevalence of obesity in severe acute respiratory syn-

## REFERENCES

1. Lamers M.M., Haagmans B.L. SARS-CoV-2 pathogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* 2022;20(5):270-284. DOI: 10.1038/s41579-022-00713-0.
2. Rovito R., Augello M., Ben-Heim A. et al. Hallmarks of severe COVID-19 pathogenesis: a pas de deux between viral and host factors. *Front. Immunol.* 2022;13:912336. DOI: 10.3389/fimmu.2022.912336.
3. Guan W.J., Ni Z.Y., Hu Y. et al. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. *N. Engl. J. Med.* 2020;382(18):1708-1720. DOI: 10.1056/NEJMoa2002032.
4. Timofeev Yu.S., Dzhioeva O.N., Drapkina O.M. Circulating biological markers of obesity: towards a systems approach. *Cardiovascular Therapy and Prevention.* 2023;22(4):3551. DOI: 10.15829/1728-8800-2023-3551. (In Russ.)
5. Nekaeva E.S., Bolshakova A.E., Malysheva E.S. et al. Gender characteristics of the novel coronavirus infection (COVID-19) in middle-aged adults. *Sovremennyye Tehnologii v Medicine.* 2021; 13(4): 16-24. 10.17691/stm2021.13.4.02. (In Russ.)
6. Anisenkova A.Yu., Apalko S.V., Asaulenko Z.P. et al. Major predictive risk factors for a cytokine storm in COVID-19 patients (a retrospective clinical trials). *Journal of Clinical Practice.* 2021;12(1):5-15. doi: 10.17816/clinpract63552.
7. Huang S., Wang J., Liu F. et al. COVID-19 patients with hypertension have more severe disease: a multi-center retrospective observational study. *Hypertens. Res.* 2020;43(8):824-831. DOI: 10.1038/s41440-020-0485-2.
8. Hamo C.E., Kwak L., Wang D. et al. Heart failure risk associated with severity of modifiable heart failure risk factors: the ARIC study. *J. Am. Heart Assoc.* 2022;11(4):e021583. DOI: 10.1161/JAHA.121.021583.
9. Lima-Martínez M.M., Boada C.C., Madera-Silva M.D. et al. COVID-19 and diabetes: A bidirectional relationship. *Clin. Investig. Arterioscler.* 2021;33(3):151-157. DOI: 10.1016/j.arteri.2020.10.001.
10. Roca-Ho H., Riera M., Palau V. et al. Characterization of ACE and ACE2 expression within different organs of the NOD mouse. *Int. J. Mol. Sci.* 2017;18(3):563. DOI: 10.3390/ijms18030563.
11. Brufsky A. Hyperglycemia, hydroxychloroquine, and the COVID-19 epidemic. *J. Med. Virol.* 2020;92:770-775. DOI: 10.1002/jmv.25887.
12. Docherty A.B., Harrison E.M., Green C.A. et al. Features of 20 133 UK patients in hospital with covid-19 using the ISARIC WHO Clinical Characterisation Protocol: prospective observational cohort study. *BMJ.* 2020;369:m1985. DOI: 10.1136/bmj.m1985.
13. Simonnet A., Chetboun M., Poissy J. et al. High prevalence of obesity in severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) requiring inva-

drome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) requiring invasive mechanical ventilation // *Obesity (Silver Spring)*. 2020;28(7):1195-1199. DOI: 10.1002/oby.22831.

### СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

**Деев Денис Андреевич** – канд. мед. наук, старший преподаватель кафедры внутренних болезней Института медицины и психологии В. Зельмана ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет»; научный сотрудник лаборатории эндокринологии ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0002-7832-7439.

**Пинхасов Борис Борисович** – д-р мед. наук, заведующий кафедрой патологической физиологии и клинической патофизиологии ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет»; ведущий научный сотрудник лаборатории эндокринологии ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0002-4579-425X.

**Лутов Юрий Владимирович** – д-р мед. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории эндокринологии ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», Новосибирск, Россия.

**Селятицкая Вера Георгиевна** – д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией эндокринологии ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0003-4534-7289.

sive mechanical ventilation. *Obesity (Silver Spring)*. 2020;28(7):1195-1199. DOI: 10.1002/oby.22831.

### ABOUT THE AUTHORS

**Denis A. Deev** – Cand. Sci. (Med.), Senior Lecturer, Department of Internal Medicine, V. Zelman Institute for Medicine and Psychology, Novosibirsk State University; Researcher, Laboratory of Endocrinology, Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0002-7832-7439.

**Boris B. Pinkhasov** – Dr. Sci. (Med.), Head, Department of Pathophysiology and Clinical Pathophysiology, Novosibirsk State Medical University; Leading Researcher, Laboratory of Endocrinology, Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0002-4579-425X.

**Yuriy V. Lutov** – Dr. Sci. (Med.), Leading Researcher, Laboratory of Endocrinology, Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russia.

**Vera G. Selyatitskaya** – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head, Laboratory of Endocrinology, Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0003-4534-7289.

## Изменения морфометрических параметров периферических эндокринных желез и показателей микроструктуры, фазового состава биоминерала регенерата большеберцовых костей после длительного воздействия бензоата натрия

В.Н. Морозов

ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» Министерства науки и высшего образования России, Белгород, Россия

### АННОТАЦИЯ

**В в е д е н и е .** Бензоат натрия является консервантом, широко применяемым в пищевой промышленности для увеличения сроков хранения продуктов питания. Однако установлены его генотоксичные, гепато- и нефротоксичные свойства, что требует продолжения изучения его влияния на организм.

**Ц е л ь .** Изучить влияние 60-дневного воздействия бензоата натрия на структуру С-клеток щитовидной железы, главных паратироцитов околощитовидных желез и спонгиоцитов пучковой зоны надпочечников с учетом изменений микроструктуры и фазового состава биоминерала регенерата большеберцовых костей при моделировании механической травмы.

**М а т е р и а л ы и м е т о д ы .** Сто двадцать белых половозрелых крыс-самцов были разделены на четыре группы (по 30 особей в каждой). Животные 1-й и 2-й групп подвергались 60-дневному воздействию бензоата натрия в дозах 500 и 1000 мг/кг, после чего моделировали травму в большеберцовых костях. В 3-й группе вместо бензоата натрия животным вводился физиологический раствор. В 4-й группе крысы получали физиологической раствор без моделирования травмы большеберцовых костей. Изучение изменений цитоморфометрических параметров С-клеток щитовидной железы осуществлялось методом электронной микроскопии на 3-и и 24-е сутки после моделирования травмы большеберцовых костей. Изучение морфометрических параметров главных паратироцитов и спонгиоцитов пучковой зоны надпочечников проводилось методом световой микроскопии на 3-и, 10, 15, 24, 45-е сутки, а показателей, характеризующих микроструктуру и фазовый состав биоминерала регенерата костей – методом рентгеноструктурного анализа в эти же сроки.

**Р е з у л ь т а т ы .** В 1-й группе площадь, занимаемая эухроматином в ядрах С-клеток, значительно уменьшалась по сравнению с 3-й группой на 24-е сутки наблюдения на 21.13 %, а во 2-й группе на 3-и и 24-е сутки – на 5.83 и 16.29 %. В 1-й и 2-й группах на 3-и, 24-е сутки соотношение площадей эухроматина и гетерохроматина было меньше на 2.65, 22.25 и 6.69, 17.69 %, диаметр секреторных гранул – на 7.47, 15.43 и 8.92, 16.00 %. Количество ядер главных паратироцитов на единицу площади уменьшалось значительно только во 2-й группе с 3-х по 15-е сутки на 3.96, 3.34, 3.68 %, а индекс функциональной активности – на 3-и сутки на 6.34 %. Количество ядер спонгиоцитов на единицу площади в пучковой зоне значительно уменьшалось в обеих группах с 3-х по 45-е сутки на 2.87, 2.40 и 5.57, 3.91 %. В 1-й группе индекс функциональной активности спонгиоцитов был меньше лишь с 3-х по 15-е сутки на 7.20, 6.78, 4.54 %, а во второй группе – во все сроки на 10.73 и 7.23 %. В биоминерале регенерата большеберцовых костей у крыс 1-й группы выявлено значимое увеличение размера элементарных ячеек вдоль оси *c* на 15 и 24-е сутки на 0.23 и 0.17 %. Во 2-й группе увеличение размера элементарных ячеек вдоль оси *a* было значимым с 15-х по 45-е сутки на 0.28, 0.15, 0.13 %, а размера элементарных ячеек вдоль оси *c* – с 10-х по 45-е сутки на 0.18, 0.23, 0.21, 0.12 %. В этих же группах установлена значимая положительная связь между такими параметрами, как количество ядер главных паратироцитов, спонгиоцитов пучковой зоны и размером элементарных ячеек вдоль осей *a*, *c*, процентным содержанием витлокита, а связь между параметром «соотношение площадей эухроматина и гетерохроматина в ядрах С-клеток» была положительной на 3-и сутки и отрицательной на 24-е сутки.

**З а к л ю ч е н и е .** Морфофункциональное состояние С-клеток, главных паратироцитов и спонгиоцитов пучковой зоны дозозависимо угнетается предшествующим 60-дневным введением бензоата натрия. Это сопровождается

Поступила в редакцию 31.01.2024  
Прошла рецензирование 13.02.2024  
Принята к публикации 01.03.2024

Автор, ответственный за переписку  
Морозов Виталий Николаевич: ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» Министерства образования и науки РФ. 308015, г. Белгород, ул. Победы, 85.  
E-mail: morozov\_v@bsu.edu.ru

Received 31.01.2024  
Revised 13.02.2024  
Accepted 01.03.2024

Corresponding author  
Vitaliy N. Morozov: Belgorod National Research University, 85, Pobedy str., Belgorod, 308015, Russia.  
E-mail: morozov\_v@bsu.edu.ru

ется нарушением компенсаторно-восстановительных процессов в периоде репаративного остеогенеза. Методом корреляционного анализа установлены различные по силе и направленности связи между изменениями морфометрических параметров эндокринных желез и микроструктуры регенерата.

**Ключевые слова:** С-клетки, главные паратироциты, спонгиоциты пучковой зоны, морфометрические параметры, микроструктура и фазовый состав, регенерат, бензоат натрия, корреляционный анализ.

**Образец цитирования:** Морозов В.Н. Изменения морфометрических параметров периферических эндокринных желез и показателей микроструктуры, фазового состава биоминерала регенерата большеберцовых костей после длительного воздействия бензоата натрия // Journal of Siberian Medical Sciences. 2024;8(3):19-36. DOI: 10.31549/2542-1174-2024-8-3-19-36

## Changes in the morphometric parameters of the peripheral endocrine glands and microstructure indicators, phase composition of the biomineral of the regenerating tibias after long-term exposure to sodium benzoate

V.N. Morozov

Belgorod National Research University, Belgorod, Russia

### ABSTRACT

**I n t r o d u c t i o n .** Sodium benzoate is a preservative widely used in the food industry to increase the shelf life of food products. However, its genotoxic, hepatotoxic and nephrotoxic properties have been established, which requires further study of its effects on the body.

**A i m .** To study the effect of a 60-day exposure to sodium benzoate on the structure of the thyroid C-cells, the main parathyroid cells and the spongiocytes of the adrenal zona fasciculata, taking into account changes in the microstructure and phase composition of the biomineral of the regenerating tibias amid modeling a mechanical injury.

**M a t e r i a l s a n d m e t h o d s .** One hundred and twenty albino mature male rats were divided into four groups (30 animals in each group). Animals of groups 1 and 2 were exposed to sodium benzoate for 60 days at doses of 500 and 1000 mg/kg, after which a defect in the tibias was simulated. In group 3, instead of sodium benzoate, the animals were injected with saline solution. In group 4, rats received saline without simulating the tibial injury. The study of changes in the cytomorphometric parameters of the thyroid C-cells was carried out using electron microscopy on the 3rd and 24th days after defect modeling. The study of the morphometric parameters of the main parathyroid cells and spongiocytes of the adrenal zona fasciculata was carried out by light microscopy on days 3, 10, 15, 24, 45, and the indicators characterizing the microstructure and phase composition of the biomineral of the regenerating bones were studied by X-ray diffraction analysis at the same time points.

**R e s u l t s .** In group 1, the area occupied by euchromatin in the nuclei of C-cells significantly decreased compared to group 3 on the 24th day by 21.13%, and in group 2 on the 3rd and 24th day – by 5.83 and 16.29%. In groups 1 and 2, on the 3rd and 24th day, the ratio of euchromatin and heterochromatin areas was less by 2.65, 22.25 and 6.69, 17.69%, the diameter of secretory granules – by 7.47, 15.43 and 8.92, 16.00%. The number of nuclei of the main parathyroid cells per area unit decreased significantly only in group 2 from the 3rd to 24th day by 3.96, 3.34, 3.68%, and the functional activity index decreased on the 3rd day by 6.34%. The number of spongiocyte nuclei per area unit in the zona fasciculata decreased significantly in both groups from the 3rd to 45th day – by 2.87, 2.40 and 5.57, 3.91%. In the 1st group, the index of functional activity of spongiocytes was lower only from the 3rd to 15th day by 7.20, 6.78, 4.54%, and in the second group – in all time points by 10.73 and 7.23%. In the biomineral of the regenerating tibias in rats of group 1, a significant increase in the size of unit cells along the *c* axis was revealed on the 15th and 24th days by 0.23 and 0.17%. In group 2, the increase in the size of unit cells along the *a* axis was significant from the 15th to 45th day by 0.28, 0.15, 0.13%, and the increase in the size of the unit cells along the *c* axis was significant from the 10th to 45th day by 0.18, 0.23, 0.21, 0.12%. In same groups, a significant positive correlation was found between such parameters as the number of nuclei of the main parathyroid cells, spongiocytes of the zona fasciculata and the size of unit cells along the *a*, *c* axes, the percentage of whitlockite, and the correlation between the parameter “ratio of the areas of euchromatin and heterochromatin in the C-cell nuclei” was positive on the 3rd day and negative on the 24th day.

**C o n c l u s i o n .** The morphofunctional state of C-cells, main parathyroid cells and spongiocytes of the zona fasciculata is dose-dependently inhibited by the previous 60-day administration of sodium benzoate. This is accompanied by alteration of compensatory and restorative processes during reparative osteogenesis. Using the correlation analysis, rela-

tionships of varying strength and direction were found between changes in the morphometric parameters of the endocrine glands and the microstructure of the regenerating bones.

**Keywords:** C-cells, main parathyroid cells, spongicytes of the zona fasciculata, morphometric parameters, microstructure and phase composition, regenerate, sodium benzoate, correlation analysis.

**Citation example:** Morozov V.N. Changes in the morphometric parameters of the peripheral endocrine glands and microstructure indicators, phase composition of the biomineral of the regenerating tibias after long-term exposure to sodium benzoate. *Journal of Siberian Medical Sciences*. 2024;8(3):19-36. DOI: 10.31549/2542-1174-2024-8-3-19-36

## ВВЕДЕНИЕ

Травматизм является актуальной медико-социальной проблемой, затрагивающей каждого человека в процессе жизнедеятельности [1]. Травматическое повреждение твердых и мягких тканей организма сопровождается системной реакцией организма, в которой первоочередную роль играют железы внутренней секреции, в частности щитовидная, околощитовидные железы и надпочечники. Гормоны, синтезируемые и секретируемые данными органами, создают, в зависимости от степени тяжести травмы, необходимый гормональный фон для поддержания баланса анаболических и катаболических процессов и обеспечения восстановления целостности области повреждения [2].

В настоящее время индустрия производства продуктов питания не может обходиться без использования пищевых добавок, в частности пищевых консервантов. Это связано с тем, что без их добавления в состав продуктов последние подвергаются быстрой порче даже после предварительной термической обработки и имеют короткий срок годности [3]. Использование в промышленных целях пищевого консерванта – бензоата натрия – позволяет устранить данную проблему, поскольку он обладает свойствами угнетать активность бактерий и грибков [4]. При этом не следует игнорировать сообщения о побочных действиях бензоата натрия на организм – его способности в кишечнике преобразовываться в бензол в сочетании с аскорбиновой кислотой, оказывать гено-, нефро- и гепатоксические эффекты [5, 6], что ставит вопрос об актуальности дальнейшего изучения его влияния на организм.

В имеющейся научной литературе морфофункциональные изменения щитовидной, околощитовидных желез и надпочечников [7], а также микроструктуры и фазового состава биоминерала регенерата костей [8] в разные периоды после травмы довольно полно освещены.

## INTRODUCTION

Traumatism is an urgent medical and social problem that affects every person throughout life [1]. Traumatic damage to hard and soft tissues of the body is accompanied by a systemic reaction of the body, in which the primary role is played by the endocrine glands, in particular, thyroid, parathyroid glands and adrenal glands. Hormones synthesized and secreted by these organs create, depending on the severity of injury, the necessary endocrine profile to maintain the balance of anabolic and catabolic processes and ensure restoration of the integrity of the damaged area [2].

Currently, food industry cannot exist without the use of food additives, in particular food preservatives. This is due to the fact that without their addition to products, the latter are subject to rapid degradation even after preliminary heating, and have a short shelf life [3]. The use of a food preservative, sodium benzoate for industrial purposes eliminates this problem since it has the properties of inhibiting bacterial and fungal growth [4]. At the same time, one should not ignore reports of side effects of sodium benzoate on the body – its ability in the intestine to be converted into benzene in combination with ascorbic acid, to have geno-, nephro- and hepatotoxic effects [5, 6], which raises the question of the relevance of further study of its influence on the body.

In the available literature, morphofunctional changes in the thyroid, parathyroid glands and adrenal glands [7], as well as the microstructure and phase composition of the biomineral of regenerating bones [8] in different periods after injury are quite fully covered. However, data on the reactivity of these organs under long-term previous intake of food additives, in particular sodium benzoate, into the body is not provided.

## AIM OF THE RESEARCH

To study the effect of a 60-day exposure to sodium benzoate on the structure of the thyroid C-cells, the

Однако информация о реактивности данных органов в условиях длительного предшествующего поступления в организм пищевых добавок, в частности бензоата натрия, не представлена.

## ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучить влияние 60-дневного воздействия бензоата натрия на структуру С-клеток щитовидной железы, главных паратироцитов околощитовидных желез и спонгиоцитов надпочечников с учетом изменений микроstructures и фазового состава биоминерала регенерата большеберцовых костей при механической травме.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Из 120 белых половозрелых крыс-самцов (масса 200–210 г) сформировали четыре экспериментальные группы (по 30 особей в каждой). Животным первых двух групп внутрижелудочно в течение 60 сут вводили 1 мл раствора бензоата натрия в дозах 500 и 1000 мг/кг, а после завершения данного воздействия моделировали механическую травму большеберцовых костей (стоматологическим бором диаметром 2 мм создавался сквозной циркулярный дефект в месте перехода проксимального эпифиза большеберцовой кости в ее диафиз) [9]. В третьей группе животным вводили 0.9% изотонический раствор натрия хлорида вместо бензоата натрия и также моделировали механическую травму большеберцовых костей. Четвертая группа была сформирована из животных, которые в течение 60 сут получали только физиологический раствор без моделирования травмы костей. Поскольку видовая чувствительность крысы и человека к экспериментальным воздействиям разная, то доза вводимого бензоата натрия корректировалась с использованием формулы Рыболовлевых [10]. В ходе эксперимента с использованием лабораторных крыс руководствовались положениями Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза [11]. Протокол исследования утвержден на заседании комиссии по биоэтике Луганского государственного медицинского университета им. Святителя Луки» (№ 2, 25.03.2022 г.) Для исследования изменений околощитовидных желез и надпочечников на светоптическом уровне на 3-и, 10, 15, 24 и 45-е сутки после моделирования травмы большеберцовых костей крысы подвергались эвтаназии путем вдыхания летальной дозы наркоза диэтилового эфира с последующей декапитацией. Забор щитовидных желез для электронно-микроскопического исследования осуществляли на 3-и и

main parathyroid cells and the adrenal spongiocytes, taking into account changes in the microstructure and phase composition of the biomineral of the regenerating tibias amid a mechanical injury.

## MATERIALS AND METHODS

Four experimental groups (30 animals in each group) were formed from 120 albino mature male rats (weight 200–210 g). Animals of the first two groups were administered intragastrically for 60 days with 1 ml of sodium benzoate solution at doses of 500 and 1000 mg/kg, and after completion of this exposure, a mechanical injury to the tibias was simulated (a dental 2 mm bur was used to make a perforated circular defect at the junction at the point of transition of the proximal epiphysis of the tibias and its diaphysis) [9]. In the third group, animals were injected with 0.9% saline instead of sodium benzoate, and a mechanical injury to the tibias was also simulated. The fourth group was formed from animals that received only saline for 60 days without simulating bone defect. Since the species sensitivity of rats and humans to experimental influences is different, the dose of sodium benzoate was adjusted using the Rybolovlev formula [10]. During the experiment using laboratory rats, we were guided by the provisions of Directive 2010/63/EU of the European Parliament and the Council [11]. The study protocol was approved by the Bioethics Commission of St. Luka Lugansk State Medical University (No. 2, 25.03.2022). To study changes in the parathyroid and adrenal glands at the light-optical level on days 3, 10, 15, 24 and 45 after modeling the injury to the tibias, rats were euthanized by inhaling a lethal dose of diethyl ether followed by decapitation. The thyroid glands were collected for electron microscopy on the 3rd and 24th days after the animals were removed from the experiment by decapitation. Histological processing of samples of glands, their embedding in homogenized Histomix paraffin, sectioning, and staining were carried out in accordance with standard protocols for light and electron microscopy [12]. For morphometry of histological sections, we used a hardware complex consisting of a personal computer with Nis-Elements BR 4.60.00 software, a Nikon Eclipse Ni microscope and a Nikon DS-Fi3 digital camera (Nikon Corporation, Japan). In the central and peripheral parts of parathyroid glands, the number of nuclei of the main cells of parathyroid glands per area unit was counted, and the maximal ( $D_{max}$ ) and minimal diameters ( $D_{min}$ ) of their nuclei measured, followed by calculation of the average value ( $MD_{nucl}$ ) using the formula [13]

$$MD_{nucl} = \sqrt{D_{max} \cdot D_{min}}$$

24-е сутки после выведения животных из эксперимента методом декапитации. Гистологическую проводку кусочков желез, их заливку в гомогенизированную парафиновую среду Histomix, изготовление срезов, их окраску проводили в соответствии со стандартными протоколами для световой и электронной микроскопии [12]. Для морфометрии гистологических срезов использовали аппаратный комплекс, состоящий из персонального компьютера с программным обеспечением Nis-Elements BR 4.60.00, микроскопа Nikon Eclipse Ni и цифровой камеры Nikon DS-Fi3 (Nikon Corporation, Japan). В околощитовидных железах в центральных и периферических отделах подсчитывали количество ядер главных паратироцитов на единицу площади и измеряли наибольший ( $D_{max}$ ) и наименьший диаметры ( $D_{min}$ ) их ядер с последующим вычислением среднего значения ( $MD_{яд}$ ) по формуле [13]

$$MD_{яд} = \sqrt{D_{max} \cdot D_{min}}$$

Индекс функциональной активности (InFA) главных паратироцитов рассчитывался по формуле [13]

$$InFA = (N_{яд} \cdot MD_{яд}) / 20,$$

где  $N_{яд}$  – количество ядер главных паратироцитов на единицу площади.

В надпочечниках подсчитывали количество ядер спонгиоцитов на единицу площади в пучковой зоне и измеряли наибольший и наименьший диаметры их ядер на гистологических срезах. Определение среднего диаметра ядер этих клеток и их функциональной активности проводили по вышеуказанным формулам.

В компьютерной программе ImageJ (NIH, USA) на загруженных электронограммах С-клеток щитовидной железы не менее чем в десяти клетках проводили измерение площади, занимаемой эухроматином и гетерохроматином, с последующим вычислением их соотношения в ядре, а также средней площади митохондрий и диаметра секреторных гранул.

Для изучения микроструктуры биоминерала регенерата большеберцовых костей и его фазового состава использовали метод рентгеноструктурного анализа [14]. Рассчитывали размер элементарных ячеек вдоль осей **a** и **c** – структурно-функциональных единиц минерала, представляющих собой наименьшую упаковку атомов, формирующую вещество конкретного минерала. Также определяли процентное содержание витлокита и кальцита в биоминерале регенерата большеберцовых костей.

The index of functional activity (InFA) of the main cells of the parathyroid glands was calculated using the formula [13]

$$InFA = (N_{nucl} \cdot MD_{nucl}) / 20,$$

where  $N_{nucl}$  – number of nuclei of the main cells of the parathyroid glands per unit area.

In the adrenal glands, the number of spongiocyte nuclei per area unit in the zona fasciculata was counted, and the maximal and minimal diameters of their nuclei were measured on histological sections. The average diameter of the nuclei of these cells and their functional activity were determined using the abovementioned formulas.

Using ImageJ software (NIH, USA), the areas of euchromatin and heterochromatin were measured on downloaded electron diffraction patterns of the thyroid C-cells in at least ten cells, followed by calculation of their ratio in the nucleus, as well as the average area of mitochondria and the diameter of secretory granules.

To study the microstructure of the biomineral of regenerating tibias and its phase composition, X-ray diffraction analysis was used [14]. The size of unit cells along the **a** and **c** axes was calculated – the structural and functional units of the mineral, which represent the smallest atomic packing that forms the substance of a particular mineral. The percentage of whitlockite and calcite in the biomineral of the regenerating tibias was also determined.

Next, the numerical data were downloaded into Microsoft Office Excel 2017 (Microsoft, USA), where variation series were built and the data were checked for the normality of distribution using the Shapiro-Wilk test. In case of normal data distribution, the parametric Student's *t*-test for differences in means was used. In other cases, the non-parametric Mann-Whitney test was used in Statistica 10.0 (StatSoft Inc., USA) for comparative analysis of data from different groups. Differences were deemed statistically significant if the probability of error was less than 5%. To identify the relationship between the cytomorphometric parameters of endocrine gland cells and the indicators obtained during X-ray analysis of the regenerating tibias, a correlation analysis was used. The latter was carried out between the parameters of the peripheral endocrine glands (the number of nuclei of the main parathyroid cells per area unit, the number of nuclei of spongiocytes of the adrenal zona fasciculata per area unit, the ratio of the areas of euchromatin and heterochromatin of the C-cell nuclei), and the parameters of the microstructure and phase composition of the biomineral of the regenerating tibias (size of unit cells along **a** and **c**

Далее числовые данные замеров переносили в программу Microsoft Office Excel 2017 (Microsoft, USA), где выстраивали вариационные ряды и осуществляли проверку данных на нормальность распределения при помощи критерия Шапиро – Уилка. В случае нормального распределения данных использовали параметрический критерий Стьюдента для сравнения средних величин. В остальных случаях в программе Statistica 10.0 (StatSoft Inc., USA) для сравнительного анализа данных различных групп применяли непараметрический критерий Манна – Уитни. Различия считали статистически значимыми при вероятности ошибки менее 5 %. Для выявления связи между цитоморфометрическими параметрами клеток изучаемых эндокринных желез и показателями, полученными после проведения рентгенструктурного анализа регенерата большеберцовых костей, использовали корреляционный анализ. Последний был проведен между параметрами периферических эндокринных желез (количество ядер главных паратироцитов на единицу площади, количество ядер спонгиозитов пучковой зоны надпочечников на единицу площади, соотношение площадей эухроматина и гетерохроматина ядер С-клеток) и параметрами микроструктуры и фазового состава биоминерала регенерата большеберцовых костей (размер элементарных ячеек вдоль осей *a* и *c*, процентное содержание кальцита и витлокита). Коэффициент ранговой корреляции Спирмена был использован для оценки степени связи между вышеуказанными параметрами. Слабой корреляционную связь считали при значении коэффициента корреляции  $\rho \leq 0.19$ , умеренной –  $0.30–0.49$ , средней –  $0.50–0.69$ , сильной  $\geq 0.70$ . Степень связи между параметрами считали достоверной в случаях, когда фактическое значение коэффициента корреляции Спирмена было больше критического ( $\rho = 0.829$  при  $\alpha = 0.05$  для 6 животных в группе).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В третьей группе, в которой моделирование механической травмы большеберцовых костей осуществлялось после 60-дневного введения физиологического раствора, изменение площади, занимаемой эухроматином в ядрах С-клеток, по сравнению с значениями четвертой группы, имело лишь характер тенденции к увеличению на 3-и сутки (на 5.41 %), и значение данного параметра было значимо выше на 24-е сутки наблюдения на 20.84 % ( $p < 0.05$ ). Соотношение площадей эухроматина и гетерохроматина стати-

axes, percentage of calcite and whitlockite). Spearman's rank correlation coefficient ( $\rho$ ) was used to assess the strength of association between the above-mentioned parameters. A correlation was considered low when the correlation coefficient was  $\rho \leq 0.19$ , mild –  $0.30–0.49$ , moderate –  $0.50–0.69$ , strong  $\geq 0.70$ . The degree of correlation between parameters was considered reliable if the actual value of the Spearman's correlation coefficient was greater than the critical value ( $\rho = 0.829$  at  $\alpha = 0.05$  for 6 animals in the group).

## RESULTS

In the third group with the tibial mechanical injury simulated after a 60-day administration of saline, the change in the area of euchromatin in the of C-cell nuclei, compared with the values of the fourth group, only tended to increase on the 3rd day (by 5.41%), and the value of this parameter was significantly higher on the 24th day of the experiment – by 20.84% ( $p < 0.05$ ). The ratio of the areas of euchromatin and heterochromatin significantly increased by 9.12 ( $p < 0.05$ ), 30.34% ( $p < 0.05$ ), and the change in the area of heterochromatin, on the contrary, had only a tendency to decrease on the 3rd and 24th days (on 3.38 and 7.33%). The diameter of secretory granules and the average area of C-cell mitochondria increased significantly on the 24th day by 22.09 and 11.89% ( $p < 0.05$ ), and on the 3rd day their changes tended to increase (by 4.03 and 2.42%) (Table 1). These ultrastructural changes indicate a gradual increase in the functional activity of these cells towards the late stages of reparative osteogenesis.

In the same group, it was found that the tibial injury simulation is accompanied by an increase in the proliferative potential and functional activity of the main parathyroid cells, as evidenced by a statistically significant increase in the number of nuclei of these cells per area unit from the 3rd to 45th day by 6.63, 6.46, 6.78, 5.89 and 3.55% ( $p < 0.05$ ). The change in the average diameter of the nuclei of these cells only tended to increase at the same time (by 21.5, 1.24, 1.80, 1.23 and 1.67%). The index of functional activity of the main parathyroid cells increased significantly from the 3rd to 24th day by 8.98, 7.84, 8.79, 7.22% ( $p < 0.05$ ) and did not change significantly on the 45th day (by 5.32%) compared with the data in the control group.

In the adrenal glands, spongiocytes of the zona fasciculata responded to the tibial injury by enhancing their morphofunctional state. In the third group, the number of nuclei of these cells per area unit was greater than the values in the fourth group from the

**Таблица 1.** Параметры ультраструктуры С-клеток щитовидной железы крыс в группах в зависимости от сроков наблюдения**Table 1.** Parameters of the ultrastructure of thyroid C-cells of rats in groups depending on the time point

| Номер группы / Group number  | 3-и сутки / 3rd day        | 24-е сутки / 24th day      |
|--|----------------------------|----------------------------|
| <i>Площадь, занимаемая эухроматином, мкм<sup>2</sup> / Area of euchromatin, μm<sup>2</sup></i>   |                            |                            |
| 1  | 9.01 ± 0.14                | 10.35 ± 0.13 <sup>•</sup>  |
| 2  | 7.48 ± 0.12 <sup>•</sup>   | 9.20 ± 0.10 <sup>•</sup>   |
| 3  | 9.49 ± 0.12                | 10.99 ± 0.13*              |
| 4  | 9.00 ± 0.10                | 9.09 ± 0.09                |
| <i>Площадь, занимаемая гетерохроматином, мкм<sup>2</sup> / Area of heterochromatin, μm<sup>2</sup></i>                                     |                            |                            |
| 1  | 4.97 ± 0.08                | 5.01 ± 0.10                |
| 2  | 5.17 ± 0.08 <sup>•</sup>   | 5.05 ± 0.08 <sup>•</sup>   |
| 3  | 5.10 ± 0.10                | 4.97 ± 0.10                |
| 4  | 5.28 ± 0.08                | 5.35 ± 0.07                |
| <i>Соотношение площадей эухроматина и гетерохроматина, усл. ед.<br/>Ratio of areas of euchromatin and heterochromatin, arbitrary units</i> |                            |                            |
| 1  | 1.81 ± 0.004 <sup>•</sup>  | 2.07 ± 0.02 <sup>•</sup>   |
| 2  | 1.45 ± 0.01 <sup>•</sup>   | 1.82 ± 0.01 <sup>•</sup>   |
| 3  | 1.86 ± 0.01*               | 2.21 ± 0.02*               |
| 4  | 1.70 ± 0.01                | 1.70 ± 0.01                |
| <i>Диаметр секреторных гранул, нм / Diameter of secretory granules, nm</i>   |                            |                            |
| 1  | 155.54 ± 1.70 <sup>•</sup> | 180.42 ± 1.71 <sup>•</sup> |
| 2  | 142.15 ± 1.31 <sup>•</sup> | 166.41 ± 0.84 <sup>•</sup> |
| 3  | 168.09 ± 2.18              | 198.10 ± 2.12*             |
| 4  | 161.58 ± 1.92              | 162.25 ± 1.69              |
| <i>Средняя площадь митохондрий, мкм<sup>2</sup> / Average area of mitochondria, μm<sup>2</sup></i>   |                            |                            |
| 1  | 9.61 ± 0.11 <sup>•</sup>   | 10.94 ± 0.15 <sup>•</sup>  |
| 2  | 9.05 ± 0.13                | 9.97 ± 0.15 <sup>•</sup>   |
| 3  | 10.28 ± 0.10               | 11.30 ± 0.17*              |
| 4  | 10.03 ± 0.14               | 10.10 ± 0.16               |

\* Достоверное отличие показателей третьей группы от показателей четвертой группы при  $p < 0.05$ .

Significant difference between the indicators of the third and fourth groups at  $p < 0.05$ .

• Достоверное отличие показателей первой и второй групп от показателей третьей группы при  $p < 0.05$ .

Significant difference between the indicators of the first and second groups from the indicators of the third group at  $p < 0.05$ .

стически значимо увеличивалось на 9.12 ( $p < 0.05$ ), 30.34 % ( $p < 0.05$ ), а изменение площади, занимаемой гетерохроматином, напротив, имело лишь характер тенденции к уменьшению на 3-и и 24-е сутки (на 3.38 и 7.33 %). Диаметр секреторных гранул и средняя площадь митохондрий С-клеток значимо увеличивались на 24-е сутки на 22.09 и 11.89 % ( $p < 0.05$ ), а на 3-и сутки их изменения имели характер тенденции к увеличению (на 4.03 и 2.42 %) (табл. 1). Данные ультраструктурные изменения указывают на постепенное увеличение функциональной активности данных клеток к поздним срокам репаративного остеогенеза.

В этой же группе было установлено, что моделирование травмы большеберцовых костей

3rd to 45th day by 15.32, 10.60, 8.80, 7.49 and 3.02% ( $p < 0.05$ ). The average diameter of the spongocyte nuclei in the zona fasciculata increased significantly from the 3rd to 15th day by 8.26, 6.05, 5.65% ( $p < 0.05$ ), and their index of functional activity increased from the 3rd to 24th day by 24.84%, 17.29, 14.94, 9.58% ( $p < 0.05$ ). The change in the values of the first parameter on the 24th and 45th days had only an increasing tendency (by 1.94 and 1.02%), and the second indicator – on the 45th day (by 4.37%). As can be seen from the dynamics of changes in indicators, the maximal range of their deviations is on the 3rd day, after which it gradually decreases by the 45th day.

X-ray structural analysis of the biomineral of the regenerating tibias showed that the size of the unit

сопровождается увеличением пролиферативного потенциала и функциональной активности главных паратироцитов, о чем свидетельствует статистически значимое увеличение количества ядер данных клеток на единицу площади с 3-х по 45-е сутки на 6.63, 6.46, 6.78, 5.89 и 3.55 % ( $p < 0.05$ ). Изменение среднего диаметра ядер данных клеток имело лишь характер тенденции к возрастанию в эти же сроки (на 21.5, 1.24, 1.80, 1.23 и 1.67 %). Индекс функциональной активности главных паратироцитов значимо возрастал с 3-х по 24-е сутки на 8.98, 7.84, 8.79, 7.22 % ( $p < 0.05$ ) и не достоверно изменялся на 45-е сутки (на 5.32 %) по сравнению с данными контрольной группы.

В надпочечниках на травму в большеберцовых костях спонгиоциты пучковой зоны реагировали усилением своего морфофункционального состояния. В третьей группе количество ядер этих клеток на единицу площади было больше значений в четвертой группе с 3-х по 45-е сутки на 15.32, 10.60, 8.80, 7.49 и 3.02 % ( $p < 0.05$ ). Средний диаметр ядер спонгиоцитов пучковой зоны статистически значимо возрастал с 3-х по 15-е сутки на 8.26, 6.05, 5.65 % ( $p < 0.05$ ), а их индекс функциональной активности – с 3-х по 24-е сутки на 24.84, 17.29, 14.94, 9.58 % ( $p < 0.05$ ). Изменение значений первого параметра на 24 и 45-е сутки имело лишь характер тенденции к увеличению (на 1.94 и 1.02 %), а второго показателя – на 45-е сутки (на 4.37 %). Как видно из динамики изменений показателей, максимальная амплитуда их отклонений регистрируется на 3-и сутки, после чего она постепенно снижается к 45-м суткам.

Рентгеноструктурный анализ биоминерала регенерата большеберцовых костей показал, что размер элементарных ячеек вдоль оси *a* значимо увеличивался на 3-и и 10-е сутки наблюдения на 0.15 и 0.13 % ( $p < 0.05$ ) и уменьшался с 15-х по 45-е сутки на 0.12, 0.13, 0.10 % ( $p < 0.05$ ). Изменение размера элементарных ячеек вдоль оси *c* имело лишь характер тенденции к увеличению на 3-и и 10-е сутки (на 0.13 и 0.06 %). Значение данного параметра статистически значимо уменьшалось на 15 и 24-е сутки на 0.24 и 0.17 % ( $p < 0.05$ ) и не значимо – на 45-е сутки на 0.06 %.

В третьей группе содержание кальция было больше, чем значение данного показателя в четвертой группе, с 3-х по 24-е сутки на 50.73, 42.71, 15.45, 12.30 % и меньше на 45-е сутки на 3.41 % ( $p < 0.05$ ). Изменение содержания витлокита в биоминерале имело характер тенденции к уменьшению на 3-и и 45-е сутки (на 0.96 и 5.84 %) и увеличению с 10-х по 24-е сутки (на 7.48, 4.26, 9.07 %).

cells along the *a* axis significantly increased on the 3rd and 10th days by 0.15 and 0.13% ( $p < 0.05$ ) and decreased between days 15th and 45th by 0.12, 0.13, 0.10 % ( $p < 0.05$ ). The change in the size of unit cells along the *c* axis only tended to increase on the 3rd and 10th days (by 0.13 and 0.06%). The value of this parameter decreased significantly on the 15th and 24th day by 0.24 and 0.17% ( $p < 0.05$ ) and not significantly on day 45 by 0.06%.

In the third group, the calcite content has increased in the fourth group between the 3rd and 24th day by 50.73, 42.71, 15.45, 12.30%, and decreased on the 45th day by 3.41% ( $p < 0.05$ ). The change in the whitlockite content in the biomineral tended to decrease on the 3rd and 45th day (by 0.96 and 5.84%) and increase from the 10th to 24th day (by 7.48, 4.26, 9.07%).

A sixty-day administration of sodium benzoate before the simulation of the tibial injury caused a decrease in the values of cytomorphometric parameters of C-cells, compared with the data of the group without the food additive administration (third group). In the first group, the change in the area of euchromatin only tended to decrease on the 3rd day (by 5.08%), and on the 24th day this parameter differed significantly from the values in the control group – by 21.13% ( $p < 0.05$ ). The ratio of the areas of euchromatin and heterochromatin was smaller on days 3 and 24 – by 2.65 and 22.25% ( $p < 0.05$ ); the diameter of secretory granules was lower by 7.47 and 15.43% ( $p < 0.05$ ); the average area of mitochondria – by 6.55 and 11.97% ( $p < 0.05$ ). In the second group, the area of euchromatin decreased significantly on the 3rd and 24th days – by 5.83 and 16.29% ( $p < 0.05$ ); the ratio of the areas of euchromatin and heterochromatin – by 6.69 and 17.69% ( $p < 0.05$ ); the diameter of the secretory granules – by 8.92 and 16.00% ( $p < 0.05$ ); the average area of mitochondria – on the 24th day by 11.77% ( $p < 0.05$ ). The value of the latter on the 3rd day in the second group had only a tendency to decrease (by 3.13%).

In the first group, the change in the area of heterochromatin only tended to decrease on the 3rd day (by 2.55%) and increase on the 24th day (by 0.91%). In the second group, this parameter increased significantly in both time points by 1.37 and 1.64% ( $p < 0.05$ ). From the above it follows that in the first and second groups, the thyroid C-cells are in a depressed morphofunctional state at the time of mechanical bone injury simulation, and during reparative osteogenesis, the range of reactive changes in their cytomorphometric parameters is less than in animals of the third group.

Шестидесятисуточное введение бензоата натрия до момента моделирования травмы в большеберцовых костях вызывало уменьшение значений цитоморфометрических параметров С-клеток, по сравнению с данными группы без введения пищевой добавки (третья группа). В первой группе изменение площади, занимаемой эухроматином, имело лишь характер тенденции к уменьшению на 3-и сутки (на 5.08 %), а на 24-е сутки данный параметр значимо отличался от значений контрольной группы на 21.13 % ( $p < 0.05$ ). Соотношение площадей эухроматина и гетерохроматина было меньше на 3-и и 24-е сутки на 2.65 и 22.25 % ( $p < 0.05$ ), диаметр секреторных гранул – на 7.47 и 15.43 % ( $p < 0.05$ ), средняя площадь митохондрий – на 6.55 и 11.97 % ( $p < 0.05$ ). Во второй группе площадь, занимаемая эухроматином, статистически значимо уменьшалась на 3-и и 24-е сутки на 5.83 и 16.29 % ( $p < 0.05$ ), соотношение площадей эухроматина и гетерохроматина – на 6.69 и 17.69 % ( $p < 0.05$ ), диаметр секреторных гранул – на 8.92 и 16.00 % ( $p < 0.05$ ), средняя площадь митохондрий – на 24-е сутки на 11.77 % ( $p < 0.05$ ). Значение последнего параметра на 3-и сутки во второй группе имело лишь характер тенденции к уменьшению (на 3.13 %).

В первой группе изменение площади, занимаемой гетерохроматином, имело лишь характер тенденции к уменьшению на 3-и сутки (на 2.55 %) и увеличению на 24-е сутки (на 0.91 %). Во второй группе данный параметр значимо увеличивался в оба срока наблюдения на 1.37 и 1.64 % ( $p < 0.05$ ). Из вышеуказанного следует, что в первой и второй группах С-клетки щитовидной железы находятся к моменту моделирования механической травмы костей в угнетенном морфофункциональном состоянии, и в периоде репаративного остеогенеза амплитуда реактивных изменений их цитоморфометрических параметров меньше, чем у животных третьей группы.

Подобная дозозависимая тенденция зафиксирована в околотитовидных железах крыс первой и второй групп. В первой группе изменение количества ядер главных паратироцитов на единицу площади, их среднего диаметра и индекса функциональной активности имело лишь характер тенденции к уменьшению с 3-х по 45-е сутки (на 1.9, 1.53, 1.72, 0.61, 0.06 %, на 1.24, 0.85, 2.17, 0.25, 0.59 % и на 3.19, 2.36, 3.83, 0.83, 0.65 %). Во второй группе количество ядер главных паратироцитов было значимо меньше значений третьей группы с 3-х по 15-е сутки на 3.96, 3.34, 3.68 % ( $p < 0.05$ ), а индекс функциональной активно-

А similar dose-dependent trend was revealed in the parathyroid glands of rats of the first and second groups. In the first group, the change in the number of nuclei of the main parathyroid cells per area unit, their average diameter and the index of functional activity had only a tendency to decrease from the 3rd to the 45th day (by 1.9, 1.53, 1.72, 0.61, 0.06%, by 1.24, 0.85, 2.17, 0.25, 0.59% and by 3.19, 2.36, 3.83, 0.83, 0.65%). In the second group, the number of nuclei of the main parathyroid cells was significantly lower than in the third group from the 3rd to 15th day by 3.96, 3.34, 3.68% ( $p < 0.05$ ), and the index of functional activity – on the 3rd day – by 6.34% ( $p < 0.05$ ). In the same group, the change in the number of nuclei of the main parathyroid cells per area unit on the 24th and 45th day had only a tendency to decrease (by 2.58 and 0.19%), the average diameter of the nuclei of these cells – from the 3rd to 45th day (on 2.48, 1.10, 2.82, 0.62, 1.55%) and their functional activity index – from the 10th to 45th day (at 4.41, 6.36, 3.17, 1.72%) (Table 2).

In the adrenal glands, the injury in the tibias after a previous 60-day administration of sodium benzoate was accompanied by a decrease in the values of morphometric parameters of the spongocytes of the zona fasciculata compared to the third group. In the first and second groups, the number of the spongocyte nuclei per area unit in this zone was significantly lower from the 3rd to 45th day by 2.87, 3.33, 2.17, 3.21, 2.40% ( $p < 0.05$ ) and 5.57, 4.19, 3.50, 4.00, 3.91% ( $p < 0.05$ ). In the first group, the change in the average diameter of the spongocyte nuclei had only a tendency to decrease between the 15th to 45th day (by 2.43, 0.53, 1.70%), and their index of functional activity – on the 24th and 45th day (by 3.73, 4.06%). In this group, the values of the first parameter were significantly lower than those in the third group on days 3 and 10 by 4.47 and 3.57% ( $p < 0.05$ ), and the values of the second parameter – between the 3rd and 15th day by 7.20, 6.7, 4.54% ( $p < 0.05$ ). In the second group, the average diameter of the spongocyte nuclei and the index of their functional activity decreased significantly during all time points, respectively, by 5.47, 5.09, 4.63, 3.52%, 3.45% ( $p < 0.05$ ) and 10.73, 9.07, 7.96, 7.38, 7.23% ( $p < 0.05$ ) (Table 3). These changes indicate a decrease in the reactivity of the spongocytes of the zona fasciculata in response to bone injury due to previous long-term exposure to a chemical factor – sodium benzoate. Considering the range of changes in morphometric parameters in the first and second groups, we can conclude that they are associated with the dose of sodium benzoate administered.

**Таблица 2.** Параметры главных паратироцитов крыс в группах в зависимости от сроков наблюдения  
**Table 2.** Parameters of the main parathyroid cells of rats in groups depending on the time point

| Номер группы<br>Group number  | 3-е сутки<br>3rd day | 10-е сутки<br>10th day | 15-е сутки<br>15th day | 24-е сутки<br>24th day | 45-е сутки<br>45th day |
|---|----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| <i>Количество ядер главных паратироцитов на единицу площади, шт.<br/>Number of nuclei of the main parathyroid cells per area unit, pcs.</i>         |                      |                        |                        |                        |                        |
| 1   | 31.94 ± 0.33         | 31.98 ± 0.39           | 32.11 ± 0.35           | 32.22 ± 0.30           | 31.79 ± 0.35           |
| 2   | 31.30 ± 0.35         | 31.40 ± 0.28           | 31.47 ± 0.33           | 31.58 ± 0.40           | 31.74 ± 0.34           |
| 3   | 32.59 ± 0.35*        | 32.48 ± 0.36*          | 32.67 ± 0.31*          | 32.42 ± 0.26*          | 31.81 ± 0.38*          |
| 4   | 30.56 ± 0.42         | 30.51 ± 0.35           | 30.60 ± 0.45           | 30.61 ± 0.32           | 30.72 ± 0.32           |
| <i>Средний диаметр ядер главных паратироцитов, мкм<br/>Average diameter of nuclei of the main parathyroid cells, μm</i>                             |                      |                        |                        |                        |                        |
| 1   | 5.32 ± 0.07          | 5.26 ± 0.06            | 5.27 ± 0.07            | 5.33 ± 0.11            | 5.35 ± 0.07            |
| 2   | 5.25 ± 0.05•         | 5.25 ± 0.06•           | 5.23 ± 0.09•           | 5.31 ± 0.07            | 5.30 ± 0.10            |
| 3   | 5.38 ± 0.05          | 5.31 ± 0.06            | 5.39 ± 0.07            | 5.34 ± 0.08            | 5.38 ± 0.07            |
| 4   | 5.27 ± 0.06          | 5.24 ± 0.04            | 5.29 ± 0.08            | 5.28 ± 0.06            | 5.29 ± 0.07            |
| <i>Индекс функциональной активности главных паратироцитов, усл. ед.<br/>Index of functional activity of main parathyroid cells, arbitrary units</i> |                      |                        |                        |                        |                        |
| 1   | 8.49 ± 0.19          | 8.42 ± 0.20            | 8.47 ± 0.20            | 8.59 ± 0.25            | 8.51 ± 0.21            |
| 2   | 8.22 ± 0.18•         | 8.25 ± 0.17            | 8.24 ± 0.23            | 8.39 ± 0.21            | 8.42 ± 0.24            |
| 3   | 8.77 ± 0.18*         | 8.63 ± 0.20*           | 8.80 ± 0.19*           | 8.66 ± 0.20*           | 8.57 ± 0.21            |
| 4   | 8.06 ± 0.14          | 8.00 ± 0.11            | 8.09 ± 0.15            | 8.08 ± 0.15            | 8.14 ± 0.17            |

\* Достоверное отличие показателей третьей группы от показателей четвертой группы при  $p < 0.05$ .

Significant difference between the indicators of the third and fourth group at  $p < 0.05$ .

• Достоверное отличие показателей первой и второй групп от показателей третьей группы при  $p < 0.05$ .

Significant difference between the indicators of the first and second groups from the indicators of the third group at  $p < 0.05$ .

сти – на 3-и сутки на 6.34 % ( $p < 0.05$ ). В этой же группе изменение количества ядер главных паратироцитов на единицу площади на 24 и 45-е сутки имело лишь характер тенденции к уменьшению (на 2.58 и 0.19 %), среднего диаметра ядер данных клеток – с 3-х по 45-е сутки (на 2.48, 1.10, 2.82, 0.62, 1.55 %) и их индекса функциональной активности – с 10-х по 45-е сутки (на 4.41, 6.36, 3.17, 1.72 %) (табл. 2).

В надпочечниках травма в большеберцовых костях после предшествующего 60-дневного введения бензоата натрия сопровождалось уменьшением значений морфометрических параметров спонгиоцитов пучковой зоны по сравнению с третьей группой. В первой и второй группах количество ядер спонгиоцитов на единицу площади в этой зоне было значимо меньше с 3-х по 45-е сутки на 2.87, 3.33, 2.17, 3.21, 2.40 % ( $p < 0.05$ ) и 5.57, 4.19, 3.50, 4.00, 3.91 % ( $p < 0.05$ ). В первой группе изменение среднего диаметра ядер спонгиоцитов имело лишь характер тенденции к уменьшению с 15-х по 45-е сутки (на 2.43, 0.53, 1.70 %), а их индекса функциональной активности – на 24 и 45-е сутки (на 3.73, 4.06 %). В этой группе значения первого параметра были зна-

A study of the microstructure of the biomineral of the regenerating tibias and its phase composition in animals of the first group showed that the change in the size of unit cells along the  $a$  axis only tended to increase from the 3rd to 45th day (by 0.01, 0.05, 0.24, 0.10, 0.07 %), and the size of unit cells along the  $c$  axis – on the 3rd, 10th, 45th day (by 0.07, 0.12, 0.06%). In this group, the value of the second parameter significantly increased on days 15 and 24 by 0.23 and 0.17% ( $p < 0.05$ ). In the first group, the proportion of calcite in the biomineral of the regenerating tibias was significantly less than in the third group on the 3rd day by 12.16% ( $p < 0.05$ ) and more from the 15th to 45th day by 17.88, 13.00, 6.77% ( $p < 0.05$ ). On the 10th day, the change in this parameter only tended to increase (by 1.49%). The proportion of whitlockite significantly increased on the 3rd day by 14.03% ( $p < 0.05$ ), then decreased insignificantly on the 10th and 15th days by 3.03 and 0.08% ( $p > 0.05$ ), and again, significantly increased on the 24th and 45th days by 4.44 and 6.01% ( $p < 0.05$ ).

In the second group, the change in the size of unit cells along the  $a$  axis was significant from the 15th to the 45th day by 0.28, 0.15, 0.13% ( $p < 0.05$ )

**Таблица 3.** Параметры спонгиоцитов пучковой зоны надпочечников крыс в зависимости от сроков наблюдения  
**Table 3.** Parameters of the spongiocytes of the adrenal zona fasciculata of rats depending on the time point

| Номер группы<br>Group Number   | 3-и сутки<br>3rd day      | 10-е сутки<br>10th day    | 15-е сутки<br>15th day    | 24-е сутки<br>24th day    | 45-е сутки<br>45th day    |
|--|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| <i>Количество ядер спонгиоцитов на единицу площади, шт.<br/>Number of spongiocyte nuclei per unit area, pcs.</i>                 |                           |                           |                           |                           |                           |
| 1  | 14.11 ± 0.08 <sup>•</sup> | 13.54 ± 0.08 <sup>•</sup> | 13.47 ± 0.08 <sup>•</sup> | 13.35 ± 0.08 <sup>•</sup> | 13.22 ± 0.09 <sup>•</sup> |
| 2  | 13.72 ± 0.09 <sup>•</sup> | 13.42 ± 0.08 <sup>•</sup> | 13.29 ± 0.07 <sup>•</sup> | 13.24 ± 0.08 <sup>•</sup> | 13.02 ± 0.06 <sup>•</sup> |
| 3  | 14.53 ± 0.09*             | 14.00 ± 0.09*             | 13.77 ± 0.08*             | 13.79 ± 0.08*             | 13.55 ± 0.09*             |
| 4  | 12.60 ± 0.09              | 12.66 ± 0.07              | 12.65 ± 0.09              | 12.83 ± 0.09              | 13.11 ± 0.08              |
| <i>Средний диаметр ядер спонгиоцитов, мкм<br/>Average diameter of spongiocyte nuclei, μm</i>                                     |                           |                           |                           |                           |                           |
| 1  | 6.34 ± 0.06 <sup>•</sup>  | 6.31 ± 0.06 <sup>•</sup>  | 6.29 ± 0.05               | 6.26 ± 0.05               | 6.18 ± 0.05               |
| 2  | 6.28 ± 0.05 <sup>•</sup>  | 6.21 ± 0.05 <sup>•</sup>  | 6.15 ± 0.06 <sup>•</sup>  | 6.08 ± 0.05 <sup>•</sup>  | 6.06 ± 0.05 <sup>•</sup>  |
| 3  | 6.64 ± 0.05*              | 6.54 ± 0.05*              | 6.45 ± 0.05*              | 6.30 ± 0.05               | 6.28 ± 0.05               |
| 4  | 6.13 ± 0.05               | 6.17 ± 0.06               | 6.11 ± 0.05               | 6.18 ± 0.06               | 6.22 ± 0.05               |
| <i>Индекс функциональной активности спонгиоцитов, усл. ед.<br/>Index of functional activity of spongiocytes, arbitrary units</i> |                           |                           |                           |                           |                           |
| 1  | 4.48 ± 0.07 <sup>•</sup>  | 4.27 ± 0.06 <sup>•</sup>  | 4.24 ± 0.06 <sup>•</sup>  | 4.18 ± 0.06               | 4.08 ± 0.06               |
| 2  | 4.31 ± 0.06 <sup>•</sup>  | 4.17 ± 0.06 <sup>•</sup>  | 4.09 ± 0.06 <sup>•</sup>  | 4.02 ± 0.06 <sup>•</sup>  | 3.95 ± 0.05 <sup>•</sup>  |
| 3  | 4.82 ± 0.06*              | 4.58 ± 0.07*              | 4.44 ± 0.06*              | 4.32 ± 0.06*              | 4.26 ± 0.06               |
| 4  | 3.86 ± 0.06               | 3.91 ± 0.06               | 3.86 ± 0.06               | 3.97 ± 0.06               | 4.08 ± 0.06               |

\* Достоверное отличие показателей третьей группы от показателей четвертой группы при  $p < 0.05$ .

Significant difference between the indicators of the third and fourth groups at  $p < 0.05$ .

• Достоверное отличие показателей первой и второй групп от показателей третьей группы при  $p < 0.05$ .

Significant difference between the indicators of the first and second groups from the indicators of the third group at  $p < 0.05$ .

чимо меньше таковых в третьей группе на 3-и и 10-е сутки на 4.47 и 3.57 % ( $p < 0.05$ ), а второго показателя – с 3-х по 15-е сутки на 7.20, 6.7, 4.54 % ( $p < 0.05$ ). Во второй группе средний диаметр ядер спонгиоцитов и индекс их функциональной активности значительно уменьшались во все сроки наблюдения соответственно на 5.47, 5.09, 4.63, 3.52, 3.45 % ( $p < 0.05$ ) и 10.73, 9.07, 7.96, 7.38, 7.23 % ( $p < 0.05$ ) (табл. 3). Данные изменения указывают на уменьшение реактивности спонгиоцитов пучковой зоны в ответ на травму костей из-за предшествующего длительного воздействия на них химического фактора – бензоата натрия. Учитывая амплитуду изменений морфометрических параметров в первой и второй группах, можно заключить, что они связаны с дозой вводимого бензоата натрия.

Исследование микроструктуры биоминерала регенерата большеберцовых костей и его фазового состава у животных первой группы показало, что изменение размера элементарных ячеек вдоль оси *a* имело лишь характер тенденции к увеличению с 3-х по 45-е сутки (на 0.01, 0.05, 0.24, 0.10, 0.07 %), а размера элементарных ячеек вдоль оси *c* – на 3-и, 10, 45-е сутки (на 0.07, 0.12, 0.06 %). В

and only tended to increase on the 3rd and 10th days (by 0.04 and 0.09%). The change in the size of unit cells along the *c* axis was significant from the 10th to 45th day by 0.18, 0.23, 0.21, 0.12% ( $p < 0.05$ ) and only tended to increase on the 3rd day (by 0.11%). The proportion of calcite in the biomineral of the regenerating tibias of rats of the second group was significantly less on the 3rd day – by 13.22%, and higher on the rest days by 3.44, 19.38, 15.28, 10.86% ( $p < 0.05$ ). In this group, the proportion of whitlockite increased significantly on days 3, 15, 24, 45 by 16.24, 2.13, 6.38, 9.26% ( $p < 0.05$ ), and its change only tended to decrease on the 10th day (by 1.55%). Based on the results obtained, we can conclude that a 60-day exposure to sodium benzoate before simulating the tibial injury influences on the structural organization of the crystal lattice of the biomineral in the bone injury area and changes the balance of phases' ratio, which, during reparative osteogenesis, leads to a slowdown in their recovery to control values, which occurs in the group with the previous saline administration on the 24th and 45th days of the experiment.

To find the relationship between changes in the morphometric parameters of C-cells, main para-

этой группе значение второго параметра значимо увеличивалось на 15 и 24-е сутки на 0.23 и 0.17 % ( $p < 0.05$ ). В первой группе доля кальцита в биоминерале регенерата большеберцовых костей значимо была меньше, чем значение аналогичного параметра в третьей группе, на 3-и сутки на 12.16 % ( $p < 0.05$ ) и больше с 15-х по 45-е сутки на 17.88, 13.00, 6.77 % ( $p < 0.05$ ). На 10-е сутки изменение данного параметра имело лишь характер тенденции к увеличению (на 1.49 %). Доля витлокита значимо увеличивалась на 3-и сутки на 14.03 % ( $p < 0.05$ ), затем не значимо уменьшалась на 10 и 15-е сутки на 3.03 и 0.08 % ( $p > 0.05$ ) и снова значимо увеличивалась на 24 и 45-е сутки на 4.44 и 6.01 % ( $p < 0.05$ ).

Во второй группе изменение размера элементарных ячеек вдоль оси **a** было значимым с 15-х по 45-е сутки на 0.28, 0.15, 0.13 % ( $p < 0.05$ ) и имело лишь характер тенденции к увеличению на 3-и и 10-е сутки (на 0.04 и 0.09 %). Изменение размера элементарных ячеек вдоль оси **c** было значимым с 10-х по 45-е сутки на 0.18, 0.23, 0.21, 0.12 % ( $p < 0.05$ ) и имело лишь характер тенденции к увеличению на 3-и сутки (на 0.11 %). Доля кальцита в биоминерале регенерата большеберцовых костей крыс второй группы значимо была меньше на 3-и сутки на 13.22 % и больше в остальные сроки на 3.44, 19.38, 15.28, 10.86 % ( $p < 0.05$ ). В этой группе доля витлокита значимо увеличивалась на 3-и, 15, 24, 45-е сутки на 16.24, 2.13, 6.38, 9.26 % ( $p < 0.05$ ) и ее изменение имело лишь характер тенденции к уменьшению на 10-е сутки (на 1.55 %). Исходя из полученных результатов можно заключить, что 60-дневное воздействие бензоата натрия до момента моделирования перелома большеберцовых костей оказывает влияние на структурную организацию кристаллической решетки биоминерала области травмирования кости и изменяет соотношения фаз, что в периоде репаративного остеогенеза приводит к замедлению их восстановления до контрольных значений, что и происходит в группе с предшествующим введением физиологического раствора к 24 и 45-м суткам наблюдения.

Для установления факта наличия связей между изменениями морфометрических параметров С-клеток, главных паратироцитов, спонгиозитов пучковой зоны и параметров микроструктуры и фазового состава биоминерала регенерата большеберцовых костей в группах, в которых животные подвергались 60-дневному воздействию бензоата натрия в дозах 500 и 1000 мг/кг и механической травматизации костей,

thyroid cells, spongiocytes of the zona fasciculata and the parameters of the microstructure and phase composition of the biomineral of the regenerating tibias in groups of animals with a 60-day exposure to sodium benzoate at doses of 500 and 1000 mg/kg and mechanical trauma to bones, a correlation analysis was carried out. Among the morphometric parameters of the endocrine glands – items of correlation pairs, the choice was made on the parameters characterizing the proliferative potential of the parathyroid glands and zona fasciculata of the adrenal cortex – the number of nuclei of the main parathyroid cells and spongiocytes per area unit, and in the thyroid gland – on the ratio of the areas of euchromatin and heterochromatin in the nuclei of C-cells (an indicator reflecting an increase in the transcriptional activity of a nucleus). In contrast to the choice of cytomorphometric parameters for the endocrine glands, all parameters characterizing both the microstructure and phase composition of the biomineral – the size of unit cells along the **a** and **c** axes, the percentage of calcite and whitlockite – became the items of the correlation pairs.

In the first and second experimental groups, a significant positive correlation was found between the number of nuclei of the main parathyroid cells and the size of the unit cells along the **a** axis of the biomineral of the regenerating tibias on the 3rd, 10th, 15th, 24th, 45th days (Spearman's correlation coefficient  $\rho$  amounted to 0.943, 0.886, 0.543, 0.557, 0.643 and 0.943, 0.886, 0.814, 0.486, 0.900, respectively); the size of unit cells along the **c** axis ( $\rho = 0.843, 0.943, 0.829, 0.886, 0.543$  and  $0.600, 0.771, 0.714, 0.486, 0.886$ , respectively) (Fig. 1); the percentage of calcite ( $\rho = 0.943, 0.929, 0.814, 0.557, 0.714$  and  $0.986, 0.543, 0.886, 0.543, 0.586$ , respectively) and the percentage of whitlockite ( $\rho = 0.886, 0.557, 0.600, 0.829, 0.800$  and  $0.471, 0.943, 0.771, 0.886, 0.257$ , respectively).

A relationship similar in direction was revealed in the first and second groups between such a morphometric parameter of the adrenal glands as the number of spongiocyte nuclei per area unit in the zona fasciculata, and the microstructure parameters of the biomineral of the regenerating tibias. Thus, on days 3, 10, 15, 24, 45, a positive correlation was revealed between the first abovementioned parameter and the size of unit cells along the **a** axis ( $\rho = 0.829, 0.943, 0.771, 0.643, 0.757$  and  $0.886, 0.829, 0.471, 0.600, 0.843$ , respectively) (Fig. 2); the size of unit cells along the **c** axis ( $\rho = 0.929, 0.943, 0.886, 0.829, 0.714$  and  $0.543, 0.600, 0.314, 0.771, 0.943$ , respectively); the percentage of calcite ( $\rho = 0.943, 0.986$ ,

был проведен корреляционный анализ. Среди морфометрических параметров эндокринных желез – участников корреляционных пар выбор остановился на параметрах, характеризующих пролиферативный потенциал околощитовидных желез и пучковой зоны коркового вещества надпочечников – количество ядер главных паратироцитов и спонгиоцитов на единицу площади, а в щитовидной железе – соотношение площадей эухроматина и гетерохроматина в ядрах С-клеток (показатель, отражающий увеличение транскрипционной активности ядра). В отличие от выбора цитоморфометрических параметров для желез внутренней секреции, участниками корреляционных пар стали все изучаемые параметры, характеризующие как микроструктуру, так и фазовый состав биоминерала регенерата – размер элементарных ячеек вдоль оси *a* и *c*, процентное содержание кальцита и витлокита.

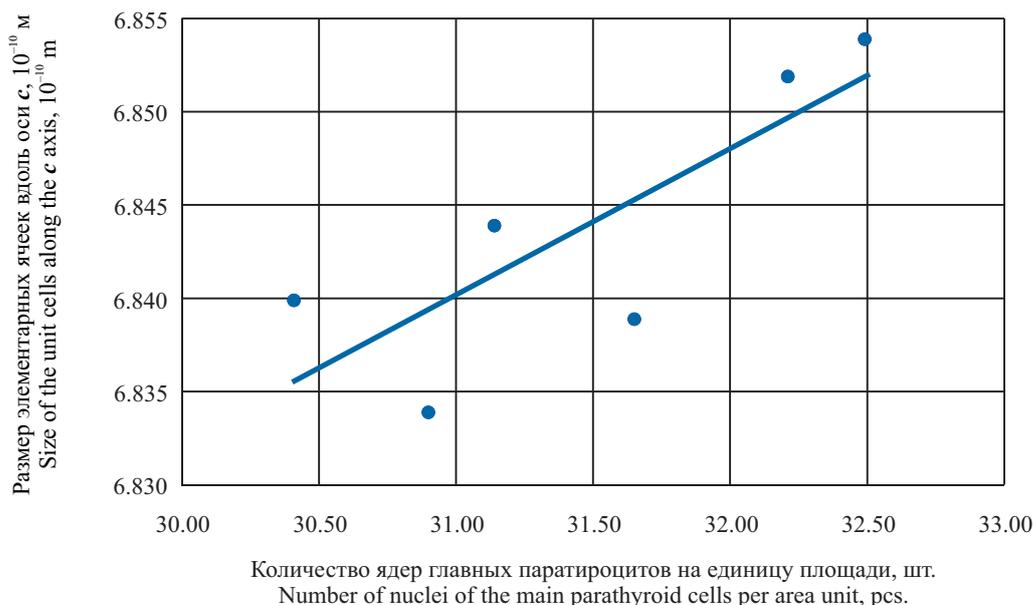
В первой и второй экспериментальных группах установлена достоверная положительная связь между количеством ядер главных паратироцитов и размером элементарных ячеек вдоль оси *a* биоминерала регенерата большеберцовых костей на 3-и, 10, 15, 24, 45-е сутки наблюдения (значение коэффициента корреляции Спирмена ( $\rho$ ) составило 0.943, 0.886, 0.543, 0.557, 0.643 и 0.943, 0.886, 0.814, 0.486, 0.900 соответственно); размером элементарных ячеек вдоль оси *c* ( $\rho = 0.843, 0.943, 0.829, 0.886, 0.543$  и  $0.600, 0.771, 0.714, 0.486, 0.886$  соответственно) (рис. 1);

0.557, 0.643, 0.771 and 0.900, 0.629, 0.971, 0.600, 0.643) and the percentage of whitlockite ( $\rho = 0.829, 0.671, 0.657, 0.943, 0.629$  and  $0.757, 0.886, 0.486, 0.971, 0.714$ , respectively).

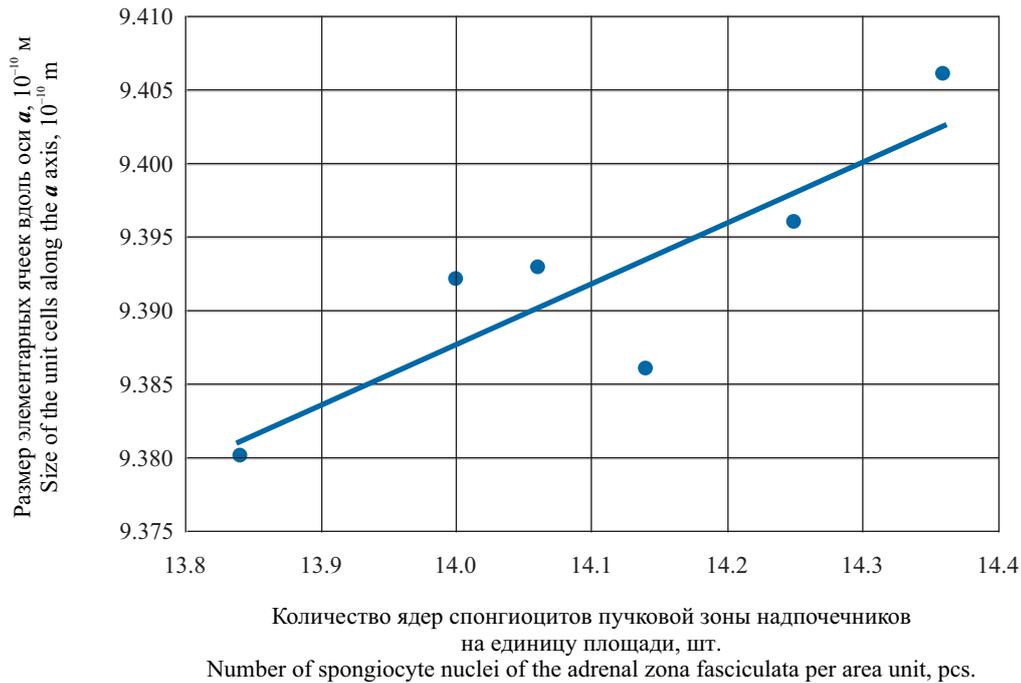
In the first and second experimental groups, a positive correlation was found on the 3rd day of the experiment between the cytormorphometric parameter of C-cell nuclei – the ratio of the areas of euchromatin and heterochromatin and the size of unit cells along the *a* axis ( $\rho = 0.771$  and  $0.486$ ), the size of unit cells along the *c* axis ( $\rho = 0.700$  and  $0.314$ ), percentage of whitlockite ( $\rho = 0.771$  and  $0.243$ ). By the 24th day, the direction of the relationship between the abovementioned parameters changed from positive to negative and the values of the Spearman's correlation coefficient were  $-0.957$  and  $-0.886$ ;  $-0.886$  and  $-0.829$ ;  $-0.943$  and  $-0.914$ , respectively. In both groups, the relationship between such indicators as the ratio of the areas of euchromatin and heterochromatin in the nuclei of C-cells and the percentage of calcite was negative both on the 3rd ( $\rho = -0.771$  and  $-0.557$ ) and on the 24th day ( $\rho = -0.900$  and  $-0.943$ ).

### DISCUSSION

According to the literature, the systemic sodium benzoate ingestion causes an imbalance in the functioning of the oxidant-antioxidant system of cells. This is due to the ability of sodium benzoate to induce oxidative stress [15], lipid peroxidation of cell membranes, and also to reduce the activity of antioxidant enzymes (in particular glutathione peroxidase) [16].



**Рис. 1.** Диаграмма рассеивания (вторая группа, 15-е сутки наблюдения)  
**Fig. 1.** The scatter diagram (second group, 15th day of the experiment)



**Рис. 2.** Диаграмма рассеивания (первая группа, 3-и сутки наблюдения)  
**Fig. 2.** The scatter diagram (first group, 3rd day of the experiment)

процентным содержанием кальция ( $\rho = 0.943, 0.929, 0.814, 0.557, 0.714$  и  $0.986, 0.543, 0.886, 0.543, 0.586$ ) и процентным содержанием витлокита ( $\rho = 0.886, 0.557, 0.600, 0.829, 0.800$  и  $0.471, 0.943, 0.771, 0.886, 0.257$ ).

Аналогичная по направленности связь установлена в первой и второй группах между таким морфометрическим параметром надпочечников, как количество ядер спонгиоцитов на единицу площади в пучковой зоне, и параметрами микроструктуры биоминерала регенерата большеберцовых костей. Так, на 3-и, 10, 15, 24, 45-е сутки выявлена положительная связь между первым вышеуказанным параметром и размером элементарных ячеек вдоль оси  $a$  ( $\rho = 0.829, 0.943, 0.771, 0.643, 0.757$  и  $0.886, 0.829, 0.471, 0.600, 0.843$  соответственно) (рис. 2); размером элементарных ячеек вдоль оси  $c$  ( $\rho = 0.929, 0.943, 0.886, 0.829, 0.714$  и  $0.543, 0.600, 0.314, 0.771, 0.943$ ); процентным содержанием кальция ( $\rho = 0.943, 0.986, 0.557, 0.643, 0.771$  и  $0.900, 0.629, 0.971, 0.600, 0.643$ ) и процентным содержанием витлокита ( $\rho = 0.829, 0.671, 0.657, 0.943, 0.629$  и  $0.757, 0.886, 0.486, 0.971, 0.714$ ).

В первой и второй экспериментальных группах положительная связь установлена на 3-и сутки наблюдения между цитоморфометрическим параметром ядер С-клеток – соотношением площадей эухроматина и гетерохроматина и раз-

The ability of this food additive has also been established to induce cell apoptosis, inflammation processes (activation of the TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 production) [17], damage of DNA of cell nuclei [18] and disrupt the process of mitosis [19]. This can explain the fact that in the first and second experimental groups, the thyroid C-cells, the main parathyroid cells and the spongiocytes of the adrenal zona fasciculata are in a depressed morphofunctional state at the time of the mechanical tibial injury simulation, and are not able to provide appropriate hormonal regulation of compensatory-adaptive processes, as occurs in the group without exposure to sodium benzoate. This is evidenced by a decrease in the area of active euchromatin in the nuclei of C-cells, the diameter of secretory granules and the average area of mitochondria, a decrease in the number of nuclei of the main parathyroid cells and spongiocytes of the zona fasciculata per area unit, their average nuclear diameter and the index of functional activity. In our previous work [20], we described morphological changes in the epithelium of the follicles and functional indicators of the thyroid gland, indicating a decrease in the functional state of thyrocytes. As is known, thyrocytes and C-cells of this organ are functionally interrelated due to their paracrine influence on each other, and changes in the morphofunctional state of the former lead to unidirectional changes in the latter [21]. A functional

мером элементарных ячеек вдоль оси **a** ( $\rho = 0.771$  и  $0.486$ ), размером элементарных ячеек вдоль оси **c** ( $\rho = 0.700$  и  $0.314$ ), процентным содержанием витлокита ( $\rho = 0.771$  и  $0.243$ ). К 24-м суткам направленность связи между указанными выше параметрами изменялась с положительной на отрицательную, и значения коэффициента корреляции Спирмена составили соответственно  $-0.957$  и  $-0.886$ ;  $-0.886$  и  $-0.829$ ;  $-0.943$  и  $-0.914$ . В обеих группах связь между такими показателями, как соотношение площадей эухроматина и гетерохроматина в ядрах С-клеток и процентное содержание кальцита, была отрицательной как на 3-и ( $\rho = -0.771$  и  $-0.557$ ), так и на 24-е сутки наблюдения ( $\rho = -0.900$  и  $-0.943$ ).

## ОБСУЖДЕНИЕ

По данным литературы систематическое поступление бензоата натрия в организм вызывает нарушение баланса функционирования оксидантно-антиоксидантной системы клеток. Это связано со способностью бензоата натрия инициировать окислительный стресс [15], перекисное окисление липидов клеточных мембран, а также снижать активность ферментов антиоксидантной защиты (в частности глутатионпероксидазы) [16]. Также установлена способность данной пищевой добавки индуцировать апоптоз клеток, процессы воспаления (активация продукции TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) [17], повреждать ДНК ядер клеток [18] и нарушать процесс митоза [19]. Этим можно объяснить то, что в первой и второй экспериментальных группах С-клетки щитовидной железы, главные паратироциты околощитовидных желез и спонгиоциты пучковой зоны надпочечников к моменту моделирования механической травмы большеберцовых костей подходят в угнетенном морфофункциональном состоянии и не способны обеспечить адекватную гормональную регуляцию компенсаторно-приспособительных процессов, как это происходит в группе без предшествующего введения бензоата натрия. Об этом свидетельствует уменьшение площади активного эухроматина в ядрах С-клеток, диаметра секреторных гранул и средней площади митохондрий, снижение количества ядер главных паратироцитов и спонгиоцитов пучковой зоны на единицу площади, их среднего диаметра ядер и индекса функциональной активности. В предыдущей собственной работе [20] мы описали морфологические изменения эпителия фолликулов и функциональных показателей щитовидной железы, свидетельствующие о снижении функционального состоя-

interrelation in the hormonal regulation of calcium and phosphorus metabolism in bone tissue has been revealed in the thyroid C-cells and the main parathyroid cells [22].

A decrease in the degree of stability of the unit cells of the crystal lattice of the biomineral of the regenerating tibias and an increase in the degree of its amorphism in the first and second experimental groups, revealed by X-ray diffraction analysis, is apparently due to the genotoxic effect of the food preservative on the DNA structure of the nuclei of osteoblasts and osteocytes and the induction of oxidative stress in them because of increased production of reactive oxygen species. Alteration in the genetic material arrangement in the abovementioned cells, damage by reactive oxygen species to phospholipids of the plasmalemma and organelles is accompanied expectedly by alteration of the processes of growth of unit cells, their arrangement into crystals and mineralization.

The correlation analysis showed that between changes in the morphometric parameters of C-cells, main parathyroid cells, spongocytes of the zona fasciculata and changes in the microstructure and phase composition of the biomineral of the regenerating tibias in the first and second groups, there is a relationship of varying strength and direction. This indicates the continuity of the processes of hormonal support for the formation of bone regeneration after long-term exposure to the chemical factor – sodium benzoate.

## CONCLUSION

The study allows us to draw the following conclusions:

1. A sixty-day administration of sodium benzoate before simulating mechanical injury in the tibias causes inhibition of the morphofunctional state of C-cells, main parathyroid cells and spongocytes of zona fasciculata, the degree of which depends on the dose of the additive. As a result, compensatory and adaptive processes associated with the restoration of bone integrity amid the altered state of the abovementioned cells occur less intensely than in the group without the administration of sodium benzoate.

2. Under similar experimental conditions, destabilization of the crystal lattice of the forming tibial regenerate and an increase in the percentage of amorphous components – calcite and whitlockite are observed. The same changes take place in the group with an isolated simulation of the tibial injury, however, in this case, by the late stages of reparative osteogenesis – 24th, 45th days they reverse, which is

ния тироцитов. Как известно, тироциты и С-клетки данного органа функционально взаимосвязаны из-за паракринного влияния друг на друга, и изменение морфофункционального состояния первых приводит к однонаправленным изменениям вторых [21]. Функциональная взаимосвязь в гормональной регуляции метаболизма кальция и фосфора в костной ткани установлена у С-клеток щитовидной железы и главных паратироцитов околотироцитов желез [22].

Выявленное методом рентгеноструктурного анализа уменьшение степени стабильности элементарных ячеек кристаллической решетки биоминерала регенерата большеберцовых костей и повышение степени его аморфности в первой и второй экспериментальных группах, по-видимому, обусловлено генотоксическим действием пищевого консерванта на структуру ДНК ядер остеобластов и остеоцитов и индуцированием развития в них окислительного стресса из-за усиления продукции активных форм кислорода. Нарушение организации генетического материала в вышеуказанных клетках, повреждение активными формами кислорода фосфолипидов плазмолеммы и органелл закономерно сопровождается нарушением процессов роста элементарных ячеек, их организации в кристаллы и минерализации.

Проведенный корреляционный анализ показал, что между изменениями морфометрических параметров С-клеток, главных паратироцитов, спонгиоцитов пучковой зоны и изменениями показателей микроструктуры и фазового состава биоминерала регенерата большеберцовых костей в первой и второй группах существует разная силы и направленности взаимосвязь. Это указывает на неразрывность процессов гормонального обеспечения процессов формирования регенерата костей в периоде после длительного воздействия химического фактора – бензоата натрия.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование позволяет сделать следующие выводы:

1. Шестидесятисуточное введение бензоата натрия до моделирования механической травмы в большеберцовых костях вызывает угнетение морфофункционального состояния С-клеток, главных паратироцитов и спонгиоцитов пучковой зоны, степень которого зависит от дозы вводимой пищевой добавки. Как следствие, компенсаторно-приспособительные про-

not observed in the groups with the administration of sodium benzoate.

3. Between the cytomorphometric parameters of С-cells, main parathyroid cells, spongocytes of zona fasciculata and the parameters of the microstructure and phase composition of the biomineral of the developing tibial regenerate, a relationship of varying strength and direction was revealed. The highest values of the Spearman's correlation coefficient were on the 3rd and 10th days of the experiment – during the period of inflammation and cell differentiation, the formation of tissue-specific structures of reparative osteogenesis. The degree of correlation between the parameters of the endocrine glands and the biomineral of the regenerated bones was higher in the group with the administration of sodium benzoate at a dose of 500 mg/kg body weight.

цессы, связанные с восстановлением целостности костей в условиях измененного состояния вышеуказанных клеток, протекают менее интенсивно, чем в группе без введения бензоата натрия.

2. В аналогичных условиях эксперимента наблюдается дестабилизация кристаллической решетки формирующегося регенерата большеберцовых костей и увеличение в нем процентного содержания аморфных составляющих – кальцита и витлокита. Такие же изменения имеют место в группе с изолированным моделированием травмы большеберцовых костей, однако в этом случае к поздним срокам репаративного остеогенеза – 24, 45-м суткам происходит их обратное развитие, что не наблюдается в группах с введением бензоата натрия.

3. Между цитоморфометрическими параметрами С-клеток, главных паратироцитов, спонгиоцитов пучковой зоны и параметрами микроструктуры и фазового состава биоминерала формирующегося регенерата большеберцовых костей выявлена различная по силе и направленности взаимосвязь. Наибольшие значения коэффициента корреляции Спирмена зарегистрированы на 3-и, 10-е сутки наблюдения – в период воспаления и дифференцировки клеток, формирования тканеспецифических структур репаративного остеогенеза. Степень связи между параметрами эндокринных желез и биоминерала регенерата была выше в группе с введением бензоата натрия в дозе 500 мг/кг массы тела.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Миронов С.П., Еськин Н.А., Андреева Т.М. и др. Динамика травматизма среди взрослого населения Российской Федерации // Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова. 2019;3:5-13. DOI: 10.17116/vto20190315.
2. Gibson S.C., Hartman D.A., Schenck J.M. The endocrine response to critical illness: update and implications for emergency medicine // Emerg. Med. Clin. N. Am. 2005;23(3):909-929. DOI: 10.1016/j.emc.2005.03.015.
3. Wu L., Zhang C., Long Y. et al. Food additives: From functions to analytical methods // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2022;62(30):8497-8517. DOI: 10.1080/10408398.2021.1929823.
4. Kaur A., Gill P.P.S., Jawandha S.K. Effect of sodium benzoate application on quality and enzymatic changes of pear fruits during low temperature // J. Food Sci. Technol. 2019;56(7):3391-3398. DOI: 10.1007/s13197-019-03823-5.
5. Pongsavee M. Effect of sodium benzoate preservative on micronucleus induction, chromosome break, and Ala40Thr superoxide dismutase gene mutation in lymphocytes // Biomed. Res. Int. 2015;2015:103512. DOI: 10.1155/2015/103512.
6. Khodaei F., Kholghipour H., Hosseinzadeh M., Rashehdinia M. Effect of sodium benzoate on liver and kidney lipid peroxidation and antioxidant enzymes in mice // J. Rep. Pharm. Sci. 2019;8(2):217-223. DOI: 10.4103/jrptps.JRPTPS\_68\_18.
7. Шурьгина Е.И., Полякова В.С., Миханов В.А. Морфофункциональные изменения в щитовидной и паращитовидных железах в ходе репаративного остеогенеза // Журнал анатомии и гистопатологии. 2018;7(2):90-94. DOI: 10.18499/2225-7357-2018-7-2-90-94.
8. Лузин В.И., Прочан В.Н., Глущенко Р.Н. Ультраструктура костного минерала, формирующегося при нанесении сквозного дырчатого дефекта большеберцовой кости у белых крыс различного возраста // Галицкий лікарський вісник. 2010;2(2):70-73.
9. Лузин В.И., Ивченко Д.В., Панкратьев А.А. Методика моделирования костного дефекта у лабораторных животных // Український медичний альманах. 2005;8(2):162.
10. Рыболовлев Ю.Р., Рыболовлев Р.С. Дозирование веществ для млекопитающих по константам биологической активности // Доклады АН СССР. 1979;6:1513-1516.
11. Directive 2010/63/ EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes // Official Journal of the European Union. 2010;53(L276):33-79. URL: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32010L0063> (дата обращения: 04.01.2024).
12. Морфологическая диагностика. Подготовка материала для гистологического исследования и электронной микроскопии: руководство / Д.Э. Коржевский, Е.Г. Гилерович, О.В. Кирик и др.; под ред. Д.Э. Коржевского. СПб.: СпецЛит, 2013. 127 с.
13. Волков В.П. Функциональная морфология паращитовидных желёз человека в возрастном аспекте //

## REFERENCES

1. Mironov S.P., Es'kin N.A., Andreeva T.M. et al. Dynamics of traumatism in adult population of the Russian Federation. *N.N. Priorov Journal of Traumatology and Orthopedics*. 2019;3:5-13. DOI: 10.17116/vto20190315. (In Russ.)
2. Gibson S.C., Hartman D.A., Schenck J.M. The endocrine response to critical illness: update and implications for emergency medicine. *Emerg. Med. Clin. N. Am.* 2005;23(3):909-929. DOI:10.1016/j.emc.2005.03.015.
3. Wu L., Zhang C., Long Y. et al. Food additives: From functions to analytical methods // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2022;62(30):8497-8517. DOI: 10.1080/10408398.2021.1929823.
4. Kaur A., Gill P.P.S., Jawandha S.K. Effect of sodium benzoate application on quality and enzymatic changes of pear fruits during low temperature. *J. Food Sci. Technol.* 2019;56(7):3391-3398. DOI: 10.1007/s13197-019-03823-5.
5. Pongsavee M. Effect of sodium benzoate preservative on micronucleus induction, chromosome break, and Ala40Thr superoxide dismutase gene mutation in lymphocytes. *Biomed. Res. Int.* 2015;2015:103512. DOI: 10.1155/2015/103512.
6. Khodaei F., Kholghipour H., Hosseinzadeh M., Rashehdinia M. Effect of sodium benzoate on liver and kidney lipid peroxidation and antioxidant enzymes in mice. *J. Rep. Pharm. Sci.* 2019;8(2):217-223. DOI: 10.4103/jrptps.JRPTPS\_68\_18.
7. Shurygina E.I., Polyakova V.S., Mikhonov V.A. Morphological changes in thyroid and parathyroid glands during the reparative osteogenesis. *Journal of Anatomy and Histopathology*. 2018;7(2):90-94. DOI: 10.18499/2225-7357-2018-7-2-90-94. (In Russ.)
8. Luzin V.I., Prochan V.N., Glushchenko R.N. Ultrastructure of bone mineral formed during the simulation of a perforated defect of the tibia in albino rats of different ages. *Galician Medical Journal*. 2010;2(2):70-73.
9. Luzin V.I., Ivchenko D.V., Pankratev A.A. Method for modeling a bone defect in laboratory animals. *Ukrainian Medical Journal*. 2005;8(2):162.
10. Rybolovlev Yu.R., Rybolovlev R.S. Dosing of substances for mammals according to biological activity constants. *Reports of the USSR Academy of Sciences*. 1979;6:1513-1516. (In Russ.)
11. Directive 2010/63/ EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes // Official Journal of the European Union. 2010;53(L276):33-79. URL: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32010L0063> (accessed 04.01.2024).
12. Korzhevskiy D.E., Gilerovich E.G., Kirik O.V. et al. (2013). *Morphological Diagnosis. Preparation of Material for Histological Examination and Electron Microscopy: Manual*. Saint Petersburg.: SpecLit. 127 p. (In Russ.)
13. Volkov V.P. The functional morphology of the human parathyroid glands in age aspect. *Modern Medicine: Current Issues*. 2014;32:6-16. (In Russ.)
14. Mirkin L.I. (1981). *X-ray Diffraction Analysis. Indexing Radiographs: A Reference Guide*. Moscow: Nauka. 496 p. (In Russ.)

- Современная медицина: актуальные вопросы. 2014;32:6-16.
14. Миркин Л.И. Рентгеноструктурный анализ. Индексирование рентгенограмм: справочное руководство. М.: Наука, 1981. 496 с.
  15. Yassien E.E., Mohamed A.M.S., Mahmoud M.E., Zaki A.M. Sodium benzoate induced toxicities in albino male rats: mitigating effects of *Ficus carica* and *Cymbopogon citratus* leave extract // *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2022;29(60):90567-90579. DOI: 10.1007/s11356-022-22020-0.
  16. Khoshnoud M.J., Siavashpour A., Bakhshizadeh M., Rashedinia M. Effects of sodium benzoate, a commonly used food preservative, on learning, memory, and oxidative stress in brain of mice // *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 2018;32(2). DOI: 10.1002/jbt.22022.
  17. Khan I.S., Dar K.B., Ganie S.A., Ali M.N. Toxicological impact of sodium benzoate on inflammatory cytokines, oxidative stress and biochemical markers in male Wistar rats // *Drug Chem. Toxicol.* 2022;45(3):1345-1354. DOI: 10.1080/01480545.2020.1825472.
  18. Mohiuddin M., Rokeya B., Al-Shoeb M.A., Kabir Y. Sodium benzoate in locally available soft drinks and its effect on DNA damage and liver function in rats // *Dhaka Univ. J. Biol. Sci.* 2022;30(3CSI):371-383. DOI: 10.3329/dujbs.v30i3.59030.
  19. Shahmohammadi M., Javadi M., Nassiri-Asl M. An overview on the effects of sodium benzoate as a preservative in food products // *Biotech. Health Sci.* 2016;3(3):e35084. DOI: 10.17795/bhs-35084.
  20. Морозов В.Н., Лузин В.И. Морфологические изменения фолликулов щитовидной железы крыс после 60-ти суточного воздействия бензоата натрия и моделирования перелома большеберцовых костей // *Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины.* 2023;13(3):35-43. DOI: 10.29039/2224-6444-2023-13-3-35-43.
  21. Zabel M., Dietel M., Gebarowska E., Michael R. Effect of follicular cells on calcitonin gene expression in thyroid parafollicular cells in cell culture // *Histochem. J.* 1999;31(3):175-180. DOI: 10.1023/a:1003597416140.
  22. Pereira S.S., Lobato C.B., Monteiro M.P. Cell signaling within endocrine glands: thyroid, parathyroids and adrenal glands // *Tissue-Specific Cell Signaling*; eds. by J. Silva, M. Freitas, M. Fardilha. Springer Cham, 2020. P. 63–91.
  15. Yassien E.E., Mohamed A.M.S., Mahmoud M.E., Zaki A.M. Sodium benzoate induced toxicities in albino male rats: mitigating effects of *Ficus carica* and *Cymbopogon citratus* leave extract. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2022;29(60):90567-90579. DOI: 10.1007/s11356-022-22020-0.
  16. Khoshnoud M.J., Siavashpour A., Bakhshizadeh M., Rashedinia M. Effects of sodium benzoate, a commonly used food preservative, on learning, memory, and oxidative stress in brain of mice. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 2018;32(2). DOI: 10.1002/jbt.22022.
  17. Khan I.S., Dar K.B., Ganie S.A., Ali M.N. Toxicological impact of sodium benzoate on inflammatory cytokines, oxidative stress and biochemical markers in male Wistar rats. *Drug Chem. Toxicol.* 2022;45(3):1345-1354. DOI: 10.1080/01480545.2020.1825472.
  18. Mohiuddin M., Rokeya B., Al-Shoeb M.A., Kabir Y. Sodium benzoate in locally available soft drinks and its effect on DNA damage and liver function in rats. *Dhaka Univ. J. Biol. Sci.* 2022;30(3CSI):371-383. DOI: 10.3329/dujbs.v30i3.59030.
  19. Shahmohammadi M., Javadi M., Nassiri-Asl M. An overview on the effects of sodium benzoate as a preservative in food products. *Biotech. Health Sci.* 2016;3(3):e35084. DOI: 10.17795/bhs-35084.
  20. Morozov V.N., Luzin V.I. Morphological changes in rat thyroid follicles in rats after a 60-day of exposure to sodium benzoate and modeling of tibiae fracture. *Crimean Journal of Experimental and Clinical Medicine.* 2023;13(3):35-43. DOI: 10.29039/2224-6444-2023-13-3-35-43. (In Russ.)
  21. Zabel M., Dietel M., Gebarowska E., Michael R. Effect of follicular cells on calcitonin gene expression in thyroid parafollicular cells in cell culture. *Histochem. J.* 1999;31(3):175-180. DOI: 10.1023/a:1003597416140.
  22. Pereira S.S., Lobato C.B., Monteiro M.P. (2020). Cell signaling within endocrine glands: thyroid, parathyroids and adrenal glands. In J. Silva, M. Freitas, M. Fardilha (eds.). *Tissue-Specific Cell Signaling*. Springer Cham. P. 63–91.

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРЕ

**Морозов Виталий Николаевич** – канд. мед. наук, доцент кафедры анатомии и гистологии человека ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» Министерства науки и высшего образования России, Белгород, Россия. ORCID: 0000-0002-1169-4285.

## ABOUT THE AUTHOR

**Vitaliy N. Morozov** – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Department of Human Anatomy and Histology, Belgorod National Research University, Belgorod, Russia. ORCID: 0000-0002-1169-4285.

## Кефалометрические показатели подростков и юношей Алтайского края с учетом двигательной активности и соматотипа

А.А. Мершалова<sup>1</sup>, Г.Н. Бородина<sup>2</sup>, Т.А. Литвинова<sup>1</sup>, П.А. Елясин<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России, Барнаул, Россия

### АННОТАЦИЯ

**В в е д е н и е .** Основными показателями физического развития человека являются длина и масса тела, однако для комплексной оценки необходимо учитывать и другие параметры тела человека, одними из которых являются кефалометрические показатели. Особый интерес представляет оценка показателей и индексов головы в корреляции с типом телосложения и двигательной активностью индивида.

**Ц е л ь .** Оценить основные кефалометрические показатели подростков и юношей Алтайского края с учетом соматотипа и двигательной активности.

**М а т е р и а л ы и м е т о д ы .** Было проведено соматометрическое исследование подростков и юношей с измерением размеров головы. Контингент исследования был представлен лицами мужского пола европеоидной расы в возрасте от 14 до 19 лет. Всего в исследовании приняли участие 1186 чел. Молодые люди были разделены на 6 возрастных групп с интервалом в 1 год, начиная с группы 14-летних подростков и заканчивая группой 19-летних юношей. Дополнительно группы были разделены на подгруппы с учетом двигательной активности. В первую подгруппу включены подростки и юноши, выполняющие общую гигиеническую норму по двигательной активности согласно классификации А.Г. Сухарева. Во вторую подгруппу включены подростки и юноши, превышающую данную норму.

**Р е з у л ь т а т ы .** Большинство лиц подросткового возраста имели астеническое телосложение, узкую, мезоцефальную форму головы средней высоты. Юноши представлены в большинстве нормостениками с узкой головой средней высоты.

**З а к л ю ч е н и е .** Результаты проведенного исследования в группах подростков и юношей, проживающих в Алтайском крае, показывают неоднородность изучаемых групп. Увеличение окружности головы у лиц со средней двигательной активностью по сравнению с лицами с высокой двигательной активностью наблюдается в возрасте 14 и 16 лет.

**Ключевые слова:** подростки, юноши, кефалометрия, соматотипы.

**Образец цитирования:** Мершалова А.А., Бородина Г.Н., Литвинова Т.А., Елясин П.А. Кефалометрические показатели подростков и юношей Алтайского края с учетом двигательной активности и соматотипа // Journal of Siberian Medical Sciences. 2024;8(3):37-50. DOI: 10.31549/2542-1174-2024-8-3-37-50

## Cephalometric parameters of adolescents and young men of the Altai territory taking into account their physical activity and somatotype

A.A. Mershalova<sup>1</sup>, G.N. Borodina<sup>2</sup>, T.A. Litvinova<sup>1</sup>, P.A. Elyasin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup>Altai State Medical University, Barnaul, Russia

### ABSTRACT

**I n t r o d u c t i o n .** The main parameters of a person's physical development are body height and weight, but for a comprehensive assessment it is necessary to take into account other parameters of the human body one of which is cepha-

Поступила в редакцию 29.02.2024  
Прошла рецензирование 29.03.2024  
Принята к публикации 15.04.2024

Автор, ответственный за переписку  
Мершалова Анастасия Александровна: ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России. 630091, г. Новосибирск, Красный просп., 52.  
E-mail: tsersi@mail.ru

Received 29.02.2024  
Revised 29.03.2024  
Accepted 15.04.2024

Corresponding author  
Anastasia Alexandrovna Mershalova: Novosibirsk State Medical University, 52, Krasny prosp., Novosibirsk, 630091, Russia.  
E-mail: tsersi@mail.ru

lometric ones. Of particular interest is the assessment of cephalometric parameters in correlation with somatotype and physical activity of an individual.

**A i m .** To assess the main cephalometric parameters of adolescents and young men in the Altai territory taking into account their somatotype and physical activity.

**M a t e r i a l s a n d m e t h o d s .** A somatometric study of adolescents and young men including the measurement of head sizes was performed. The study cohort was represented by Caucasian males aged 14 to 19 years. A total of 1186 people took part in the study. The young men were divided into 6 age groups with an interval of 1 year, starting with a group of 14-year-old adolescents and ending with a group of 19-year-old young men. Additionally, the groups were divided into subgroups based on physical activity. The first subgroup includes adolescents and young men who meet the general hygienic standard for physical activity according to the classification of A.G. Sukharev. The second subgroup includes adolescents and young men who exceed this hygienic standard.

**R e s u l t s .** The majority of adolescents were ectomorphs with a narrow, mesocephalic head shape and medium head height. The majority of young men were mesomorphs with a narrow head of average height.

**C o n c l u s i o n .** The results of the study in groups of adolescents and young men living in the Altai territory show the heterogeneity in the groups. An increase in head circumference in individuals with moderate physical activity compared to individuals with high physical activity is observed at the age of 14 and 16 years.

**Keywords:** adolescents, young men, cephalometry, somatotypes.

**Citation example:** Mershalova A.A., Borodina G.N., Litvinova T.A., Elyasin P.A. Cephalometric parameters of adolescents and young men of the Altai territory taking into account their physical activity and somatotype. *Journal of Siberian Medical Sciences*. 2024;8(3):37-50. DOI: 10.31549/2542-1174-2024-8-3-37-50

## ВВЕДЕНИЕ

Основной задачей антропологии является комплексное исследование факторов и форм человеческой изменчивости, для чего необходимо понимание вариантов анатомической «нормы». Для определения «нормы» следует пользоваться показателями физического развития, основные из них – длина и масса тела [1]. Однако для комплексной оценки необходимо учитывать и остальные параметры тела человека [2–4]. Данные показатели могут являться фундаментальной базой для построения целостного представления о здоровье индивида и применяться для мониторинга уровня физического развития населения [5, 6]. В системе антропометрической диагностики особое место занимает кефалометрическое исследование [7, 8]. Проведенные исследования выявили особенности и половой диморфизм структурных показателей головы, лица [9]. Человек, как единица исследования, отличается большой изменчивостью внешнего вида и строения скелета на протяжении своей истории вследствие влияния генетических и средовых факторов [10, 11]. Показатели физического развития населения разных регионов нашей страны отличаются друг от друга в связи с этническими, климатическими условиями, а также по индивидуальным причинам [12]. Закономерно изменяются и параметры головы, мозгового и лицевого черепа, а также их оценка в корреляции с типом телосложения. Исследова-

## INTRODUCTION

The main task of anthropology is a comprehensive study of the factors and forms of human variability which requires understanding the variants of the anatomical norm. To determine the norm, one should use parameters of physical development, the main ones being body height and weight [1]. However, for a comprehensive assessment, it is necessary to take into account other parameters of the human body [2–4]. These parameters can be the essential basis for the comprehensive assessment of an individual's health, and can be used to monitor the level of physical development of the population [5, 6]. In anthropometric diagnostics, a cephalometric study occupies a special place [7, 8]. The previous studies revealed the peculiarities and sexual dimorphism of the structural parameters of the head and face [9]. Man, as a subject of a study, is characterized by great variability in appearance and skeletal structure throughout his history due to the influence of genetic and environmental factors [10, 11]. Parameters of physical development of the population of various regions of our country differ from each other due to ethnic, climatic conditions, as well as for individual reasons [12]. The parameters of the head, brain and facial compartments of the skull, as well as their assessment in correlation with somatotype, also expectedly change. Studies of cephalometric parameters and head shapes in the Altai territory are few: the last one dates back to 1997 [13] which determined the relevance of this work.

ния кефалометрических показателей и форм головы в Алтайском крае малочисленны: последнее датируется 1997 г. [13], что и определило актуальность данной работы.

## ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценить основные кефалометрические показатели подростков и юношей Алтайского края с учетом соматотипа и двигательной активности.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Перспективное, рандомизированное, одномоментное исследование было проведено в период с сентября 2019 по май 2022 г. Контингент исследования был представлен лицами мужского пола европеоидной расы в возрасте от 14 до 19 лет. Всего в исследовании приняли участие 1186 чел. Молодые люди были разделены на 6 возрастных групп с интервалом в 1 год, начиная с группы 14-летних подростков и заканчивая группой 19-летних юношей.

Дополнительно группы были разделены на подгруппы с учетом двигательной активности (ДА): 1-я подгруппа со средним уровнем двигательной активности (СДА) ( $n = 693$ ); 2-я подгруппа с высоким уровнем двигательной активности (ВДА) ( $n = 493$ ). В первую подгруппу включены подростки и юноши, выполняющие общую гигиеническую норму, согласно классификации А.Г. Сухарева (1976) [14], по числу шагов в сутки (20 000–25 000 шагов для подростков при продолжительности ДА 3.6 – 4.8 ч в сутки и 25 000–30 000 шагов при продолжительности ДА 4.8 – 5.8 ч в сутки для юношей) и сохраняющие при этом обычный режим питания (отсутствие специальных спортивных либо лечебных диет). Во вторую подгруппу включены подростки и юноши, превышающую данную норму.

Каждый участник исследования (либо его законный представитель) дал информированное добровольное согласие на участие в исследовании. Не менее 2 поколений семей участников исследования проживали на территории Алтайского края. Критерии исключения: молодые люди, имеющие наследственные заболевания, психические расстройства и расстройства поведения, острые или обострение хронических соматических заболеваний на момент обследования; лица, не выполняющие общую гигиеническую норму по двигательной активности; отсутствие информированного согласия от исследуемого либо его представителя. На проведение исследования было получено положительное решение

## AIM OF THE RESEARCH

To assess the main cephalometric parameters of adolescents and young men in the Altai territory taking into account their somatotype and physical activity.

## MATERIALS AND METHODS

A prospective, randomized, cross-sectional study was performed from September 2019 to May 2022. The study cohort was represented by Caucasian males aged 14 to 19 years. A total of 1186 people took part in the study. The young men were divided into 6 age groups with an interval of 1 year, starting with a group of 14-year-old adolescents and ending with a group of 19-year-old males.

Additionally, the groups were divided into subgroups taking into account physical activity (PA): 1st subgroup with a moderate PA (MPA) ( $n = 693$ ); 2nd subgroup with a high PA (HPA) ( $n = 493$ ). The first subgroup included adolescents and young men who met the general hygienic standard, according to the classification of A.G. Sukharev (1976) [14], according to the number of steps per day (20 000–25 000 steps for adolescents with a duration of PA of 3.6–4.8 hours per day, and 25 000–30 000 steps with a duration of PA of 4.8–5.8 hours per day for young men) and while maintaining a conventional diet (no special sport nutrition or therapeutic dietary regimens). The second subgroup included adolescents and young men who exceed this hygienic standard.

Each participant of the study (or his legal representative) provided informed consent to participate in the study. At least 2 generations of the study participants' families lived in the Altai territory. Exclusion criteria were: young men with hereditary diseases, mental and behavioral disorders, acute diseases or exacerbation of chronic somatic diseases at the time of the examination; individuals who did not meet the general hygienic norm for physical activity; lack of informed consent from the subject or his representative. A positive decision was received from the Local Ethics Committee to perform the study (protocol No. 8 dated October 25, 2019).

Anthropometric measurements were performed using a single standardized method taking into account the requirements of the Research Institute of Anthropology of the Moscow State University (1982) and recommendations for monitoring the health of children, adolescents and young men in the Russian Federation [15] at educational facilities (School No. 1, Lyceum No. 2, Gymnasium No. 5 in Kamen-na-Obi; Kamenskiy Pedagogical College),

локального этического комитета (протокол № 8 от 25.10.2019).

Антропометрические исследования проводили по единой унифицированной методике с учетом требований НИИ антропологии Московского государственного университета (1982) и рекомендаций по мониторингу состояния здоровья детей, подростков и юношей в Российской Федерации [15] на базе учебных учреждений (школа № 1, лицей № 2, гимназия № 5 г. Каменьна-Оби; Каменский педагогический колледж), призывных комиссий г. Барнаула и г. Каменьна-Оби. Также участие в исследовании принимали студенты Алтайского государственного медицинского университета первого и второго курса обучения. Измерения осуществляли с использованием стандартных инструментов (медицинские весы, метрическая лента, ростомер, толстотный циркуль, шагомер электронный Omron HJ-325), без одежды и обуви (допускалось нахождение в легком нижнем белье), соблюдалась комфортная степень освещенности и температурный режим.

Измерения длины тела выполняли на медицинском ростомере. Исследуемый становится спиной к вертикальной стойке, касаясь ее пятками, ягодицами и межлопаточной областью. Взгляд перед собой, голова фиксируется, при этом козелок уха и нижний край глазницы находятся в одной горизонтальной плоскости, угольник должен быть прижат к голове напротив деления шкалы. Окружность грудной клетки измеряли лентой при вдохе, выдохе и в паузе, накладывая ее сзади под углами лопаток, спереди – на уровне сосков. Массу тела определяли при помощи электронных весов с погрешностью до 0.1 кг. Лобно-затылочный, поперечный размеры головы измеряли с помощью толстотного циркуля в контрольных точках головы.

Индекс Пинье (ИП) – показатель крепости телосложения – вычисляли по формуле: от длины тела стоя (см) вычитали сумму массы тела (кг) и окружности грудной клетки (см). М.В. Чернолуцкий в своей методике использует индекс Пинье для соматотипирования: ИП > 30 – астеник, ИП от 10 до 30 – нормостеник, ИП < 10 – гиперстеник.

При изучении размеров головы ориентировались на расположение различных антропометрических точек, принятых на Международном конгрессе антропологов во Франкфурте-на-Майне в 1884 г. Известно, что размеры головы имеют расовые, региональные, а также индивидуальные особенности. Для выявления особенностей головы подростков и юношей были определены:

and draft boards in Barnaul and Kamen-na-Obi. First- and second-year students of Altai State Medical University also took part in the study. Measurements were performed using standard tools (medical scales, soft measuring tape, stadiometer, spreading caliper, Omron HJ-325 electronic step counter), without clothes and shoes (light underwear was allowed), and a comfortable level of illumination and temperature conditions were maintained.

Body height measurements were taken using a medical stadiometer. The examined person stands with his back to a vertical stand, touching it with his heels, buttocks, and the interscapular region. The gaze is straight ahead, the head is fixed, while the tragus and the lower edge of the eye socket are in the same horizontal plane, the triangular headpiece should be pressed to the head opposite the scale division. Chest circumference was measured with a soft measuring tape during inspiration, expiration and at a pause, placing the tape at the back – under the angles of the scapulas, in front – at the level of the nipples. Body weight was measured using electronic scales with an error of up to 0.1 kg. The fronto-occipital and transverse sizes of the head were measured using a spreading calipers at control points of the head.

The Pignet index (PI) is a parameter of body robustness, calculated using the formula: the sum of body weight (kg) and chest circumference (cm) were subtracted from the body height at a standing position (cm). M.V. Chernorutsky uses the Pignet index in his method for somatotyping: PI > 30 – ectomorphic somatotype, PI from 10 to 30 – mesomorphic somatotype, PI < 10 – endomorphic somatotype.

When studying measuring the head sizes, we were guided by the location of various anthropometric points approved at the International Congress of Anthropologists in Frankfurt am Main in 1884. It is known that the head sizes have racial, regional, and individual characteristics. To identify the head characteristics of adolescents and young men, the following were determined: cephalic, altitude-longitudinal and altitude-latitudinal indices (adjusted for soft tissues +1 cm), where W is width of the head; L is length of the head; H is height of the head.

Head circumference was measured by placing the soft measuring tape across the most protruding area of the occiput and the point above the nasal bridge (glabella), the most protruding point between the eyebrows along the midline.

Head height was measured from the center of the auricle to the top of the head, and width was measured between the points of greatest width of the

цефальный, висотно-продольный и висотно-широтный индексы (с поправкой на мягкие ткани +1 см), где Ш – ширина головы; Д – длина головы; В – высота головы.

Окружность головы определяли, накладывая ленту через наиболее выступающую область затылка и точку надпереносья, наиболее выступающую вперед между бровями по срединной линии.

Высоту головы измеряли от центра ушной раковины до верхней точки головы, а ширину – между точками наибольшей ширины головы. Вычисляли следующие индексы и указатели:

1. Цефальный индекс (ЦИ) =  $(Ш/Д) \times 100\%$ ; долихоцефальная форма – ЦИ < 75%; мезоцефальная форма – ЦИ = 75–80%; брахицефальная форма – ЦИ > 80%.

2. Висотно-продольный указатель (ВПу) =  $(В/Д) \times 100\%$ ; низкая форма – ВПу < 70%; средняя форма – ВПу = 70–75%; высокая форма – ВПу > 75%.

3. Висотно-широтный указатель (ВШу) =  $(В/Ш) \times 100\%$ ; узкая форма – ВШу < 92%; средняя форма – ВШу = 92–98%; широкая форма – ВШу > 98%.

Шагометрия проводилась в течение недели, затем суммировали показания каждого дня и вычисляли среднюю величину.

Описательная статистика представлена средним значением (M) и ошибкой среднего арифметического (m). Дополнительно определялись коэффициент вариации (V), размах (Rv), максимальная (max) и минимальные (min) величины. Также был проведен корреляционный анализ. Статистический анализ полученных данных выполняли при помощи программных пакетов Excel MS Office 2016 и SPSS 22.0. Полученные выборки проверяли на нормальность распределения с помощью критериев Шапиро – Уилка и Колмогорова – Смирнова. В случае нормального распределения признака сравнения проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента для непарных выборок. В случае отличного от нормального распределения выборки использовали *U*-критерий Манна – Уитни с поправкой Бонферрони. Критический уровень значимости различий составил 0.05.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При измерениях основных показателей головы подростков и юношей Алтайского края были получены следующие результаты.

Окружность головы (табл. 1) значительно изменяется с 16-летнего возраста. При проведении

head. The following indices and parameters were calculated:

1. Cephalic index (CI) =  $(W/L) \times 100\%$ ; dolichocephaly – CI < 75%; mesocephaly – CI = 75–80%; brachycephaly – CI > 80%.

2. Altitude-longitudinal index (ALo) =  $(H/L) \times 100\%$ ; low – ALo < 70%; medium – ALo = 70–75%; high – ALo > 75%.

3. Altitude-latitudinal (ALa) =  $(H/W) \times 100\%$ ; narrow shape – ALa < 92%; medium shape – ALa = 92–98%; wide shape – ALa > 98%.

Step counting carried out for a week, then the counts for each day were summed up and the average value calculated.

Descriptive statistics are presented by the mean (M) and the standard error of the mean (m). In addition, the coefficient of variation (V), range (Rv), maximum (max) and minimum (min) values were determined. A correlation analysis was also performed. A statistical analysis of the data was performed using Excel MS Office 2016 and SPSS 22.0 software. The obtained samples were checked up for normality using the Shapiro-Wilk and Kolmogorov-Smirnov tests. When our data followed normal distribution, comparisons were performed using Student's *t*-test for unpaired samples. When the data followed non normal distribution, the Mann-Whitney *U*-test with the Bonferroni's correction was used. The critical level of significance of differences was 0.05.

## RESULTS AND DISCUSSION

When measuring the main parameters of the head of adolescents and young men of the Altai territory, the following results were obtained.

Head circumference (Table 1) changes significantly from the age of 16 years. When conducting an analysis of the groups taking into account PA, it was found that the main changes were in the 1st group of adolescents: in the age groups of 14 and 16 years, individuals with MPA have a larger head circumference – by 0.7 cm ( $p = 0.003$ ) at the age of 14 years, and by 0.3 cm ( $p = 0.035$ ) at the age of 16 years.

Head height (Table 1) increases by only 0.5 cm from 14 to 19 years. The analysis taking into account physical activity showed that head height in individuals with HPA at the age of 15 years was 0.8 cm ( $p = 0.000$ ) greater than in the MPA group, and at the age of 16 it was 0.4 cm ( $p = 0.004$ ) less than in the MPA group.

The longitudinal size of the head (head length) (Table 1) is the largest and averages 17.4–18.5 cm. Head length has significant differences taking into account PA at the age of 14 years: individuals with

**Таблица 1.** Основные антропометрические показатели головы подростков и юношей с учетом двигательной активности (см)  
**Table 1.** Main anthropometric parameters of the head of adolescents and young men taking into account physical activity (cm)

| Показатель<br>Parameter                         | Окружность<br>головы<br>Head circum-<br>ference | <i>p</i> **  | Высота<br>головы<br>Head height | <i>p</i> **  | Длина<br>головы<br>Head length | <i>p</i> **  | Ширина<br>головы<br>Head width | <i>p</i> ** |
|---|---|--------------|---------------------------------|--------------|--------------------------------|--------------|--------------------------------|-------------|
| <i>14 лет / 14 years old</i>                    |   |              |                                 |              |                                |              |                                |             |
| Средние величины<br>Average values              | 56.3 ± 0.1                                      |              | 12.8 ± 0.1                      |              | 18.2 ± 0.1                     |              | 14.2 ± 0.1                     |             |
| Лица с ВДА<br>Individuals with HPA<br>(n = 60)  | 56.0 ± 0.2                                      |              | 12.8 ± 0.1                      |              | 18.1 ± 0.1                     |              | 14.1 ± 0.1                     |             |
| Лица с СДА<br>Individuals with MPA<br>(n = 84)  | 56,7±0,2  |              | 12,8±0,1                        |              | 18,5±0,1                       |              | 14,3±0,1                       |             |
| <i>p</i> *                                      | 0.013   |              | 0.932                           |              | 0.004                          |              | 0.158                          |             |
| <i>15 лет / 15 years old</i>                    |   |              |                                 |              |                                |              |                                |             |
| Средние величины<br>Average values              | 56.4 ± 0.2                                      | 0.980        | 13.0 ± 0.1                      | 0.158        | 18.2 ± 0.1                     | 0.878        | 14.4 ± 0.1                     | 0.158       |
| Лица с ВДА<br>Individuals with HPA<br>(n = 86)  | 56.2 ± 0.2                                      |              | 13.5 ± 0.1                      |              | 18.2 ± 0.1                     |              | 14.2 ± 0.1                     |             |
| Лица с СДА<br>Individuals with MPA<br>(n = 94)  | 56.4 ± 0.2                                      |              | 12.7 ± 0.1                      |              | 18.2 ± 0.1                     |              | 14.4 ± 0.1                     |             |
| <i>p</i> *                                      | 0.480   |              | 0.000                           |              | 0.986                          |              | 0.158                          |             |
| <i>16 лет / 16 years old</i>                    |   |              |                                 |              |                                |              |                                |             |
| Средние величины<br>Average values              | 57.0 ± 0.1                                      | <b>0.000</b> | 13.0 ± 0.1                      | 0.932        | 18.4 ± 0.1                     | 0.094        | 14.2 ± 0.1                     | 0.145       |
| Лица с ВДА<br>Individuals with HPA<br>(n = 95)  | 56.8 ± 0.1                                      |              | 12.8 ± 0.1                      |              | 18.4 ± 0.1                     |              | 14.1 ± 0.1                     |             |
| Лица с СДА<br>Individuals with MPA<br>(n = 139) | 57.1 ± 0.1                                      |              | 13.2 ± 0.1                      |              | 18.4 ± 0.1                     |              | 14.3 ± 0.1                     |             |
| <i>p</i> *                                      | 0.035   |              | 0.004                           |              | 0.978                          |              | 0.158                          |             |
| <i>17 лет / 17 years old</i>                    |   |              |                                 |              |                                |              |                                |             |
| Средние величины<br>Average values              | 56.2 ± 0.1                                      | <b>0.000</b> | 13.4 ± 0.1                      | <b>0.005</b> | 17.4 ± 0.1                     | <b>0.000</b> | 14.4 ± 0.1                     | 0.078       |
| Лица с ВДА<br>Individuals with HPA<br>(n = 60)  | 56.3 ± 0.2                                      |              | 13.6 ± 0.1                      |              | 16.9 ± 0.3                     |              | 14.5 ± 0.1                     |             |
| Лица с СДА<br>Individuals with MPA<br>(n = 84)  | 56.1 ± 0.2                                      |              | 13.5 ± 0.1                      |              | 17.3 ± 0.2                     |              | 14.4 ± 0.1                     |             |
| <i>p</i> *                                      | 0.480   |              | 0.480                           |              | 0.268                          |              | 0.985                          |             |
| <i>18 лет / 18 years old</i>                    |   |              |                                 |              |                                |              |                                |             |
| Средние величины<br>Average values              | 56.9 ± 0.1                                      | <b>0.000</b> | 13.3 ± 0.1                      | 0.480        | 18.4 ± 0.1                     | <b>0.000</b> | 14.5 ± 0.1                     | 0.455       |
| Лица с ВДА<br>Individuals with HPA<br>(n = 86)  | 57.1 ± 0.1                                      |              | 13.2 ± 0.1                      |              | 18.3 ± 0.1                     |              | 14.5 ± 0.1                     |             |
| Лица с СДА<br>Individuals with MPA<br>(n = 94)  | 56.9 ± 0.1                                      |              | 13.3 ± 0.1                      |              | 18.4 ± 0.1                     |              | 14.5 ± 0.1                     |             |
| <i>p</i> *                                      | 0.158   |              | 0.480                           |              | 0.480                          |              | 0.978                          |             |

| Показатель<br>Parameter                                 | Окружность<br>головы<br>Head circum-<br>ference | <i>p</i> **  | Высота<br>головы<br>Head height | <i>p</i> ** | Длина<br>головы<br>Head length | <i>p</i> ** | Ширина<br>головы<br>Head width | <i>p</i> ** |
|---|---|--------------|---------------------------------|-------------|--------------------------------|-------------|--------------------------------|-------------|
| <i>19 лет / 19 years old</i>                            |   |              |                                 |             |                                |             |                                |             |
| Средние величины<br>Average values                      | 57.9 ± 0.1                                      | <b>0.000</b> | 13.3 ± 0.1                      | 0.932       | 18.5 ± 0.1                     | 0.567       | 14.5 ± 0.1                     | 0.978       |
| Лица с ВДА<br>Individuals with HPA<br>( <i>n</i> = 95)  | 56.7 ± 0.2                                      |              | 13.2 ± 0.1                      |             | 18.7 ± 0.1                     |             | 14.5 ± 0.1                     |             |
| Лица с СДА<br>Individuals with MPA<br>( <i>n</i> = 139) | 57.3 ± 0.1                                      |              | 13.3 ± 0.1                      |             | 18.5 ± 0.1                     |             | 14.5 ± 0.1                     |             |
| <i>p</i> *  | 0.007   |              | 0.480                           |             | 0.158                          |             | 0.932                          |             |

П р и м е ч а н и я . ВДА – высокая двигательная активность; СДА – средняя двигательная активность.

\* Статистическая значимость с учетом двигательной активности.

\*\* Статистическая значимость при сравнении с предыдущим возрастом.

N o t e s . HPA – high physical activity; MPA – moderate physical activity.

\* Statistical significance taking into account physical activity.

\*\* Statistical significance when compared with previous age.

внутригруппового анализа с учетом ДА было выявлено, что основные изменения отмечены в 1-й группе подростков: в возрастной группе 14 и 16 лет лица с СДА имеют большую окружность головы – на 0.7 см ( $p = 0.003$ ) в возрасте 14 лет и на 0.3 см ( $p = 0.035$ ) в возрасте 16 лет.

Высота головы (см. табл. 1) с 14 до 19 лет увеличивается всего на 0.5 см. Внутригрупповой анализ с учетом двигательной активности показал, что высота головы у лиц с ВДА в возрасте 15 лет на 0.8 см ( $p = 0.000$ ) больше, чем в группе лиц с СДА, а в возрасте 16 лет – меньше на 0.4 см ( $p = 0.004$ ), чем в группе лиц с СДА.

Продольный размер головы (длина головы) (см. табл. 1) является наибольшим и составляет в среднем 17.4–18.5 см. Длина головы имеет значимые различия с учетом ДА в возрасте 14 лет: лица со СДА на 0.4 см ( $p = 0.004$ ) имеют больший показатель, чем лица с ВДА.

Поперечный размер головы (ширина головы) (см. табл. 1) практически одинаков у подростков и юношей. Двигательная активность не влияет на данный показатель.

С учетом полученных данных были вычислены индекс и указатели головы.

Средняя величина головного индекса (табл. 2) в группе подростков равна  $78.3 \pm 0.3$  %, что укладывается в промежуток от 75 до 80 % и соответствует мезоцефальной форме головы. В 14 лет данный показатель равен  $78.0 \pm 0.2$  %, у подростков 15 лет – на 1.0 см больше ( $p = 0.014$ ), у 16-летних подростков – на 1.2 см меньше по сравнению с предыдущим возрастом ( $p = 0.007$ ).

MPA have a higher value by 0.4 cm ( $p = 0.004$ ) than individuals with HPA.

Head width (Table 1) is almost the same in adolescents and young men. Physical activity does not affect this parameter.

With reference to the data obtained, the index and head parameters were calculated.

The average value of the cephalic index (Table 2) in the group of adolescents is  $78.3 \pm 0.3$  %, which falls within the range from 75 to 80% and corresponds to the mesocephalic type of the head. At 14 years, this parameter is  $78.0 \pm 0.2$  %, in 15-year-old adolescents – 1.0 cm more ( $p = 0.014$ ), in 16-year-old adolescents – 1.2 cm less compared to the previous age ( $p = 0.007$ ).

The mesocephalic head shape occurs in 50.5% of cases ( $n = 282$  people) of the total number of adolescents studied, and is dominant in any age group: at the age of 14 years, it is observed in 56.3% of cases, at the age of 15 – in 45.0%, and at the age of 16 – in 51.3%. Mesocephalic individuals are characterized by intermediate values of the altitude-longitudinal index, average head values. Mesocephaly is included in the characteristics of the Far Eastern and South Asian Mongoloid races, as well as in the characteristics of the White Sea-Baltic Caucasian race [16].

The brachycephalic head shape in the group of adolescents occurs in 26.9% of cases – in 150 subjects. This head shape is recorded in 24.3% of cases at the age of 14 years, in 33.3% – at the age of 15, and in 23.5% – at the age of 16 (Table 2).

Dolichocephaly in the group of adolescents is observed in 22.6% of cases (in 126 people). The doli-

**Таблица 2.** Основные кефалометрические показатели подростков и юношей (%)  
**Table 2.** Main cephalometric parameters of adolescents and young men (%)

| Характеристика<br>Characteristics                                   | Подростки / Adolescents             |                                     |                                     | Юноши / Young men                   |                                     |                                     |
|---|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
|   | 14 лет<br>14 years old<br>(n = 144) | 15 лет<br>15 years old<br>(n = 180) | 16 лет<br>16 years old<br>(n = 234) | 17 лет<br>17 years old<br>(n = 217) | 18 лет<br>18 years old<br>(n = 223) | 19 лет<br>19 years old<br>(n = 188) |
| Среднее в группе<br>Average in the group                            | 78.3 ± 0.3                          |                                     |                                     | 80.6 ± 0.5 (p = 0.000)              |                                     |                                     |
| <i>Головной индекс (форма головы)   Cephalic index (head shape)</i> |                                     |                                     |                                     |                                     |                                     |                                     |
| M ± m   | 78.0 ± 0.2                          | 79.0 ± 0.3                          | 77.8 ± 0.3                          | 84.6 ± 0.1                          | 78.6 ± 0.2                          | 78.6 ± 0.2                          |
| p   |                                     | 0.014                               | 0.007                               | <b>0.000</b>                        | <b>0.000</b>                        | 0.978                               |
| Долихоцефалия<br>Dolichocephaly                                     | 19.4                                | 21.7                                | 25.2                                | 7.4                                 | 11.3 (n = 25)                       | 13.3 (n = 25)                       |
| Мезоцефалия<br>Mesoscephaly   | 56.3                                | 45.0                                | 51.3                                | 25.3 (n = 55)                       | 59.6                                | 57.4 (n = 108)                      |
| Брахицефалия<br>Brachycephaly                                       | 24.3                                | 33.3                                | 23.5                                | 67.3 (n = 146)                      | 28.9                                | 29.3 (n = 55)                       |
| <i>Высотно-продольный указатель   Head height</i>                   |                                     |                                     |                                     |                                     |                                     |                                     |
| M ± m   | 71.4 ± 0.4                          | 72.3 ± 0.5                          | 71.7 ± 0.3                          | 79.9 ± 1.1                          | 72.9 ± 0.3                          | 72.6 ± 0.3                          |
| p   |                                     | 0.193                               | 0.398                               | <b>0.000</b>                        | <b>0.000</b>                        | 0.442                               |
| Низкая форма<br>Low shape   | 46.5 (n = 67)                       | 34.5                                | 40.4 (n = 95)                       | 19.7                                | 26.9 (n = 62)                       | 29.3 (n = 57)                       |
| Средняя форма<br>Medium shape                                       | 36.8 (n = 53)                       | 40.5 (n = 73)                       | 46.6 (n = 109)                      | 35.8                                | 52.5                                | 50.8 (n = 96)                       |
| Высокая форма<br>High shape   | 16.7 (n = 24)                       | 25.0                                | 12.9 (n = 30)                       | 44.5                                | 20.1 (n = 46)                       | 19.8 (n = 36)                       |
| <i>Высотно-широтный указатель   Head width</i>                      |                                     |                                     |                                     |                                     |                                     |                                     |
| M ± m   | 91.2 ± 0.5                          | 91.4 ± 0.6                          | 92.1 ± 0.4                          | 94.0 ± 0.4                          | 92.7 ± 0.3                          | 92.1 ± 0.3                          |
| p   |                                     | 0.823                               | 0.151                               | <b>0.001</b>                        | <b>0.022</b>                        | 0.231                               |
| Узкая форма<br>Narrow shape   | 62.5                                | 52.2                                | 51.1                                | 38.6                                | 48.9                                | 42.1                                |
| Средняя форма<br>Medium shape                                       | 25.0                                | 31.7                                | 36.2                                | 33.9                                | 37.8                                | 50.0                                |
| Широкая форма<br>Wide shape   | 12.5                                | 16.1                                | 12.7                                | 27.5                                | 13.3                                | 7.9                                 |

Примечание. p – статистическая значимость между возрастными группами.  
 Note. p – statistical significance between ages.

Мезоцефальная форма головы встречается в 50.5 % случаев (n = 282 чел.) от общего числа исследуемых в группе подростков и является доминирующей для любого возраста внутри группы: в возрасте 14 лет она встречается в 56.3 % случаев, в возрасте 15 лет – в 45.0 % и в возрасте 16 лет – в 51.3 %. Для мезоцефалов характерно промежуточное положение высотно-продольного указателя, усредненные значения головы. Мезоцефалия включается в характеристику дальневосточной и южноазиатской монголоидных рас, а также в характеристику беломоро-балтийской европеоидной расы [16].

Брахицефальная форма головы в группе подростков встречается в 26.9 % случаев – у 150 исследуемых. Данная форма головы регистрируется в

chocephalic head shape is found in 19.4% of cases in 14-year-olds, 21.7% – in 15-year-olds, and 25.2% – in 16-year-olds (Table 2).

In the group of young men, there is a tendency towards brachycephalization: the average cephalic index in the group is 80.6 ± 0.5%, which is 2.3% higher than in the group of adolescents (p = 0.000). The brachycephalic head shape is found in 67.3% of young men at the age of 17 years, 28.9% – at the age of 18, and 29.3% – at the age of 19. Mesocephalic individuals prevail in the group of 18- and 19-year-old young men and make up 59.6 and 57.4%, respectively, of the total number and 25.3% at the age of 17 years. The dolichocephalic head shape is found in 7.4% of young men at the age of 17 years, 11.3% – at the age of 18, and 13.3% – at the age of 19.

24.3 % случаев в возрасте 14 лет, в 33.3 % – в 15 лет и в 23.5 % – в возрасте 16 лет (см. табл. 2).

Долихоцефалия в группе лиц подросткового возраста отмечается в 22.6 % случаев (у 126 чел.). Долихоцефальная форма головы встречается в 19.4 % случаев у 14-летних, в 21.7 % – у 15-летних и в 25.2 % – у 16-летних подростков (см. табл. 2).

В группе юношей отмечается тенденция к брахицефализации: средний показатель головного индекса в группе равен  $80.6 \pm 0.5$  %, что на 2.3 % больше, чем в группе подростков ( $p = 0.000$ ). Брахицефальную форму головы имеют в 17 лет 67.3 % юношей, в возрасте 18 лет – 28.9 % и в 19-летнем возрасте – 29.3 %. Мезоцефалы преобладают в группе 18- и 19-летних юношей и составляют 59.6 и 57.4 % соответственно от общего числа, а в возрасте 17 лет – 25.3 %. Долихоцефальная форма головы выявляется у 7.4 % юношей в 17-летнем возрасте, у 11.3 % – в 18-летнем и у 13.3 % – в 19-летнем возрасте.

Высота головы в большинстве случаев (43.7 % от общего числа исследуемых) определена как средняя, лишь в группе 14-летних подростков преобладает низкая форма головы – у 46.5 %, а среди 17-летних юношей чаще встречаются лица с высокой формой – у 44.5 %. У остальных исследуемых величина высотно-продольного указателя находится в пределах 70–75 %, и большинство представителей в обеих возрастных группах имеют среднюю форму головы.

Ширина головы в большинстве случаев (49.2 % от общего числа исследуемых) определяется как узкая, в возрасте 17 и 19 лет – как средняя. Наименьшее число подростков и юношей с широкой головой. Широкая форма головы чаще наблюдается в возрасте 17 лет – в 27.5 % случаев, реже в возрасте 19 лет – в 7.9 %.

Параллельно было проведено антропометрическое исследование подростков и юношей.

Длина тела (рост) является одним из наиболее важных морфологических признаков, лежащих в основе пропорции мужского телосложения. Известно, что данный показатель зависит от наследственных факторов, а также факторов внешней и внутренней среды организма.

Длина тела 14-летних подростков составила  $170.4 \pm 1.4$  см, распределение данного параметра внутри группы изменяется от минимальной величины 158.0 см до максимальной – 184.0 см (табл. 3). Показатель варьирует в пределах 26 см, что составляет 15.0 % от среднего арифметического. Коэффициент вариации равен 3.4 %. Рост 15-летних подростков на 2.6 см больше по

Head height in most cases (43.7% of the total number of subjects) is defined as medium, only in the group of 14-year-old adolescents, a low head shape dominates – 46.5%, and among 17-year-old young men a high head shape are more common – 44.5%. In the rest subjects, the value of the altitude-longitudinal index is within 70–75%, and most representatives in both age groups have a medium head shape.

Head width in most cases (49.2% of the total number of subjects) is defined as narrow, at the age of 17 and 19 years – as medium. The minimal number of adolescents and young men had a wide head. The wide head shape is more often observed at the age of 17 years – in 27.5% of cases, less often at the age of 19 – in 7.9%.

Simultaneously, it was performed an anthropometric study of adolescents and young men.

Body height is one of the most important morphological features underlying the proportions of male physique. It is known that this parameter depends on hereditary factors, as well as factors of external and internal environments of the body.

The body height of 14-year-old adolescents was  $170.4 \pm 1.4$  cm, the distribution of this parameter within the group varies from a minimum value of 158.0 cm to a maximum of 184.0 cm (Table 3). The parameter varies within 26 cm, which is 15.0% of the arithmetic mean. The coefficient of variation is 3.4%. The height of 15-year-old adolescents is 2.6 cm more than of the previous age ( $p = 0.000$ ). At 16 years old, the average height of adolescents was  $177.0 \pm 0.7$  cm. The difference with the previous age is 4.0 cm ( $p = 0.000$ ) (Table 4). The height of 17- and 18-year-old youths is almost the same –  $176.0 \pm 0.4$  and  $175.2 \pm 0.4$  cm, respectively ( $p = 0.059$ ), the range was 29 cm. The minimal height at this age is 160.0 cm, the maximal – 188 cm. Young men aged 19 were significantly taller than 18-year-olds –  $178.8 \pm 0.4$  cm, the difference with the previous age was 3.6 cm ( $p = 0.000$ ).

The analysis of the groups (Table 3) showed that at 15 years of age there was a tendency for increased body height in adolescents with HPA compared to MPA ( $173.8 \pm 0.6$  cm vs.  $172.8 \pm 0.7$  cm). At 16 years of age, the body height of individuals with HPA exceeded by 1.01% (2.2 cm) that of individuals with MPA ( $178.1 \pm 0.5$  cm vs.  $175.9 \pm 0.5$  cm ( $p = 0.002$ )). The analysis of body height in young men revealed that 18- and 19-year-old individuals with HPA were shorter than their peers with MPA ( $174.3 \pm 0.2$  cm vs.  $176.0 \pm 0.5$  cm,  $p = 0.001$  and  $176.8 \pm 0.7$  cm vs.  $178.8 \pm 0.6$  cm, respectively).

**Таблица 3.** Важнейшие антропометрические показатели группы подростков и юношей с учетом двигательной активности

**Table 3.** The main anthropometric parameters of the group of adolescents and young men taking into account physical activity

| Двигательная активность<br>Physical activity            | Длина тела, см / Body height, cm |     |     | Масса тела, кг / Body weight, kg |      |     |
|---|----------------------------------|-----|-----|----------------------------------|------|-----|
|   | М                                | SD  | m   | М                                | SD   | m   |
| <i>14 лет / 14 years old</i>                            |                                  |     |     |                                  |      |     |
| Среднее / Average                                       | 170.4                            | -   | 1.4 | 63.8                             | -    | 0.8 |
| Юноши с ВДА (n = 60)<br>Individuals with HPA (n = 60)   | 170.3                            | 5.8 | 0.7 | 64.1                             | 10.8 | 1.4 |
| Юноши с СДА (n = 84)<br>Individuals with MPA (n = 84)   | 170.6                            | 6.8 | 1.3 | 64.1                             | 12.2 | 1.3 |
| <i>p</i>  | <b>0.762</b>                     |     |     | <b>0.978</b>                     |      |     |
| <i>15 лет / 15 years old</i>                            |                                  |     |     |                                  |      |     |
| Среднее / Average                                       | 173.0                            | -   | 0.8 | 66.0                             | -    | 1.1 |
| Юноши с ВДА (n = 86)<br>Individuals with HPA (n = 86)   | 173.8                            | 5.5 | 0.6 | 67.5                             | 16.4 | 1.8 |
| Юноши с СДА (n = 94)<br>Individuals with MPA (n = 94)   | 172.8                            | 6.8 | 0.7 | 65.1                             | 14.8 | 1.5 |
| <i>p</i>  | <b>0.280</b>                     |     |     | <b>0.371</b>                     |      |     |
| <i>16 лет / 16 years old</i>                            |                                  |     |     |                                  |      |     |
| Среднее / Average                                       | 177.0                            | -   | 0.7 | 68,7                             | -    | 0.8 |
| Юноши с ВДА (n = 95)<br>Individuals with HPA (n = 95)   | 178.1                            | 5.5 | 0.5 | 74.5                             | 10.1 | 0.9 |
| Юноши с СДА (n = 139)<br>Individuals with MPA (n = 139) | 175.9                            | 6.4 | 0.5 | 63.0                             | 11.3 | 0.9 |
| <i>p</i>  | <b>0.002</b>                     |     |     | <b>0.000</b>                     |      |     |
| <i>17 лет / 17 years old</i>                            |                                  |     |     |                                  |      |     |
| Среднее / Average                                       | 176.0                            | -   | 0.4 | 68.5                             | -    | 1.0 |
| Юноши с ВДА (n = 77)<br>Individuals with HPA (n = 77)   | 176.4                            | 5.6 | 0.6 | 70.3                             | 11.9 | 1.4 |
| Юноши с СДА (n = 140)<br>Individuals with MPA (n = 140) | 176.1                            | 6.2 | 0.5 | 67.9                             | 10.0 | 0.8 |
| <i>p</i>  | 0.701                            |     |     | 0.138                            |      |     |
| <i>18 лет / 18 years old</i>                            |                                  |     |     |                                  |      |     |
| Среднее / Average                                       | 175.2                            | -   | 0.4 | 69.1                             | -    | 0.7 |
| Юноши с ВДА (n = 95)<br>Individuals with HPA (n = 95)   | 174.3                            | 7.0 | 0.2 | 74.1                             | 11.5 | 1.2 |
| Юноши с СДА (n = 128)<br>Individuals with MPA (n = 128) | 176.0                            | 6.2 | 0.5 | 65.7                             | 8.7  | 0.8 |
| <i>p</i>  | <b>0.001</b>                     |     |     | <b>0.000</b>                     |      |     |
| <i>19 лет / 19 years old</i>                            |                                  |     |     |                                  |      |     |
| Среднее / Average                                       | 178.8                            | -   | 0.4 | 72.7                             | -    | 0.7 |
| Юноши с ВДА (n = 80)<br>Individuals with HPA (n = 80)   | 176.8                            | 6.4 | 0.7 | 69.0                             | 8.3  | 0.9 |
| Юноши с СДА (n = 108)<br>Individuals with MPA (n = 108) | 178.6                            | 6.4 | 0.6 | 76.1                             | 12.2 | 1.2 |
| <i>p</i>  | <b>0.000</b>                     |     |     | <b>0.000</b>                     |      |     |

П р и м е ч а н и е . SD – стандартное отклонение; СДА – средняя двигательная активность; ВДА – высокая двигательная активность.

*p* – статистическая значимость между подростками с СДА и ВДА.

N o t e s : SD – standard deviation; MPA – moderate physical activity; HPA – high physical activity.

*p* – statistical significance between adolescents with MPA and HPA.

сравнению с предыдущим возрастом ( $p = 0.000$ ). В 16 лет средний рост подростков составил  $177.0 \pm 0.7$  см. Разница с предыдущим возрастом – 4.0 см ( $p = 0.000$ ) (табл. 4). Рост 17- и 18-летних юношей практически одинаков –  $176.0 \pm 0.4$  и  $175.2 \pm 0.4$  см соответственно ( $p = 0.059$ ), размах составил 29 см. Минимальный рост в данном возрасте равен 160.0 см, максимальный – 188 см. Молодые люди 19 лет оказались значительно выше 18-летних –  $178.8 \pm 0.4$  см, разница с предыдущим возрастом составила 3.6 см ( $p = 0.000$ ).

Внутригрупповой анализ (см. табл. 3) показал, что в 15 лет прослеживается тенденция к увеличению длины тела у подростков с ВДА по сравнению с СДА ( $173.8 \pm 0.6$  см против  $172.8 \pm 0.7$  см). В 16-летнем возрасте длина тела юношей с ВДА больше на 1.01 % (2.2 см), чем у их сверстников с СДА ( $178.1 \pm 0.5$  см против  $175.9 \pm 0.5$  см ( $p = 0.002$ )). Анализ длины тела юношей выявил, что лица с ВДА 18 и 19 лет ниже своих сверстников со СДА ( $174.3 \pm 0.2$  см против  $176.0 \pm 0.5$  см,  $p = 0.001$  и  $176.8 \pm 0.7$  см против  $178.8 \pm 0.6$  см соответственно).

Показатель массы тела является одним из основных при изучении физического развития человека, тонко реагирующим на сдвиги в состоянии здоровья. Величина этого показателя используется в индексной оценке физического развития чаще других остальных. Известно, что масса тела зависит от целого ряда факторов: питания, количества потребляемых калорий, двигательной активности, географических и климатических условий, а также гормонального фона и нервно-психического состояния индивида.

Масса тела в 14 лет составила  $63.8 \pm 0.8$  кг (см. табл. 3), значимых различий с учетом ДА в данном возрасте не выявлено ( $64.1 \pm 1.4$  и  $61.4 \pm 1.3$  кг соответственно,  $p = 0.932$ ). Подростки 15 лет имеют тенденцию к увеличению массы тела в среднем на 2.45 кг ( $66.0 \pm 1.1$  кг,  $p = 0.108$ ). Масса тела лиц с ВДА данного возраста меньше в сравнении с предыдущим возрастом ( $67.5 \pm 1.8$  кг против  $64.1 \pm 1.4$  кг,  $p = 0.004$ ). Тенденция к увеличению массы тела сохраняется и в 16 лет. Средний вес подростков в 16 лет составил  $68.7 \pm 0.8$  кг, прибавка по сравнению с предыдущим возрастом равна 2.7 кг ( $p = 0.050$ ). Масса тела молодых людей с ВДА данного возраста значительно выше по сравнению с их 15-летними сверстниками: годовая прибавка в данном возрасте составила 7.0 кг и средняя масса тела 16-летних подростков с ВДА стала равна  $74.5 \pm 0.8$  кг ( $p = 0.000$ ).

Body weight is one of the main parameters of the physical development of a person that responds sensitively to changes in the physical condition of humans. The value of this parameter is used in the assessment of physical development more often than others. It is known that body weight depends on a number of factors: nutrition, calorie intake, physical activity, geographical and climatic conditions, as well as an endocrine profile and neuropsychic status of an individual.

The body weight at 14 years was  $63.8 \pm 0.8$  kg (Table 3); no significant differences taking into account PA at this age were found ( $64.1 \pm 1.4$  and  $61.4 \pm 1.3$  kg, respectively,  $p = 0.932$ ). Adolescents aged 15 years have a tendency to an increased body weight by an average of 2.45 kg ( $66.0 \pm 1.1$  kg,  $p = 0.108$ ). The body weight of individuals with HPA at this age is less in comparison with the previous age ( $67.5 \pm 1.8$  kg vs.  $64.1 \pm 1.4$  kg,  $p = 0.004$ ). The tendency to an increased body weight persists at 16 years. The average body weight of adolescents at 16 years was  $68.7 \pm 0.8$  kg; an increase in comparison with the previous age is 2.7 kg ( $p = 0.050$ ). The body weight of young men with HPA at this age is significantly higher compared to their 15-year-old mates: an annual increase at this age was 7.0 kg and the average body weight of 16-year-old adolescents with HPA was  $74.5 \pm 0.8$  kg ( $p = 0.000$ ).

The data obtained indicate that body weight turned out to be a highly variable parameter, i.e. the body weight of some adolescents can be almost three times that of others, and also has the highest coefficient of variation ( $V = 20.3\%$ ).

Body weight has a strong correlation with almost all circumferential measurements, but most strong – with hip (0.99) and waist (0.92) circumferences, which indicates that fat plays the greatest role in the parameter. The most stable parameter with the lowest coefficient of variation was body height ( $V = 3.5\%$ ). The remaining parameters are distributed between body weight and body height.

The body weight of 17-year-old young men was  $68.8 \pm 1.0$  kg; no significant differences were found between the group of individuals with HPA and MPA at this age ( $p = 0.138$ ) (Table 3), but a tendency towards an increase in this parameter in young men with HPA at the age of 18 is: their average body weight was  $69.1 \pm 0.7$  kg; individuals with HPA at this age are heavier significantly than their peers with MPA ( $p = 0.000$ ), the difference was 8.4 kg. The opposite situation is observed at the age of 19 years since the majority of young men with HPA (47.4%)

**Таблица 4.** Количественное соотношение подростков и юношей с учетом соматотипа (% (n))  
**Table 4.** Quantitative ratio of adolescents and young men taking into account somatotype (% (n))

| Соматотип<br>Somatotype  | Подростки (приписная военная комиссия)<br>Adolescents (draft registration commission) |                        |                        | Юноши (военная врачебная комиссия)<br>Young men (draft medical commission) |                        |                        |
|--|---|------------------------|------------------------|--|------------------------|------------------------|
|  | 14 лет<br>14 years old  | 15 лет<br>15 years old | 16 лет<br>16 years old | 17 лет<br>17 years old   | 18 лет<br>18 years old | 19 лет<br>19 years old |
| Астеники (ИП более 35)<br>Ectomorphs<br>(PI more than 35)        | 48.3 (70)   | 46.6 (83)              | 40.5 (95)              | 30.7 (67)  | 35.6 (80)              | 5.26 (10)              |
| Нормостеники<br>(ИП от 10–35)<br>Mesomorphs (PI 10–35)           | 28.3 (41)   | 24.2 (43)              | 34.0 (80)              | 46.33 (98)   | 35.6 (80)              | 50.0 (94)              |
| Гиперстеники<br>(ИП менее 10)<br>Endomorphs<br>(PI less than 10) | 23.4 (34)   | 29.2 (52)              | 25.5 (60)              | 46.8 (50)  | 28.7 (64)              | 44.7 (85)              |

Примечание. ИП – индекс Пинье.  
 Note. PI – Pignet index.

Полученные данные свидетельствуют о том, что масса тела оказалась сильно варьирующим признаком, т.е. масса тела одних подростков может практически втрое превышать таковую у других, а также имеет самый высокий коэффициент вариации ( $V = 20.3\%$ ).

Масса тела имеет сильную корреляцию практически со всеми обхватными размерами, но сильнее всего – с обхватом бедер (0.99) и талии (0.92), что свидетельствует о том, что наибольшую роль в показателе имеет жировой компонент. Самым стабильным признаком с самым низким коэффициентом вариации оказалась длина тела ( $V = 3.5\%$ ). Остальные признаки распределены между массой и длиной тела.

Масса тела 17-летних юношей составила  $68.8 \pm 1.0$  кг, значимых различий между группой лиц с ВДА и СДА в данном возрасте не выявлено ( $p = 0.138$ ) (см. табл. 3), но заметна тенденция к увеличению таковой у юношей с ВДА в возрасте 18 лет: их средняя масса тела составила  $69.1 \pm 0.7$  кг, лица с ВДА данного возраста значительно тяжелее своих сверстников с СДА ( $p = 0.000$ ), разница составила 8.4 кг. Обратная ситуация наблюдается в возрасте 19 лет, так как большинство юношей с ВДА (47.4 %) занимаются кикбоксингом и каратэ. Средняя масса тела 19-летних юношей равна  $72.7 \pm 0.7$  кг. Молодые люди с СДА имеют среднюю массу тела  $76.1 \pm 1.2$  кг, лица с ВДА –  $69.0 \pm 0.9$  кг ( $p = 0.454$ ).

При анализе соматотипирования (табл. 4) выявлено, что астеников больше всего в группе 14-летних подростков. В каждом последующем возрасте процент молодых людей с таким типом телосложения уменьшается: на 1.7 % у 15-летних,

are engaged in kickboxing and karate. The average body weight of 19-year-old young men is  $72.7 \pm 0.7$  kg. Young men with MPA had an average body weight of  $76.1 \pm 1.2$  kg, while those with HPA –  $69.0 \pm 0.9$  kg ( $p = 0.454$ ).

When analyzing somatotyping (Table 4), it was found that ectomorphs were most numerous in the group of 14-year-old adolescents. At each subsequent age, the percentage of young people with this somatotype decreases: by 1.7% in 15-year-olds, by 8.3% in 16-year-olds; the lowest percentage of ectomorphs was in the group of 19-year-olds; the difference with the group of 14-year-olds was 43.6%.

## CONCLUSION

The adolescent males are ectomorphs with a mesocephalic type of head shape, narrow, medium height head. However, at the age of 14 years, a low head dominates. In 17-year-old young men, brachycephalization is observed, simultaneously with a tendency toward endomorphic somatotype, but the head shape remains narrow. In 18-year-old young men, mesomorphic and ectomorphic somatotypes with a mesocephalic, narrow head of medium height are dominant. In the group of 19-year-olds, mesomorphic and endomorphic somatotypes with a mesocephalic, medium height and width head dominate. At the age of 14 and 16 years, an increase in head circumference was found in individuals with moderate physical activity compared to individuals with high physical activity.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

на 8.3 % у 16-летних, наименьший процент астеников в группе юношей 19 лет; разница с группой 14-летних составила 43.6 %.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Лица мужского пола подросткового возраста являются астениками с мезоцефальной, узкой, средней по высоте головой. Однако в возрасте 14 лет доминирует низкая форма головы. У 17-летних юношей наблюдается процесс брахицефализации, параллельно с тенденцией к гиперстеническому соматотипу, однако форма головы остается узкой. У 18-летних юношей преобладаю-

щим является нормостенический и астенический соматотипы с мезоцефальной, узкой головой средней высоты. В группе 19-летних преобладают лица нормостенического и гиперстенического соматотипа с мезоцефальной формой, средней высоты и ширины головой. В возрасте 14 и 16 лет выявили увеличение окружности головы у лиц со средней двигательной активностью по сравнению с лицами с высокой двигательной активностью.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kryst Ł., Kowal M., Woronkiewicz A. et al. Secular changes in height, body weight, body mass index and pubertal development in male children and adolescents in Krakow, Poland // *J. Biosoc. Sci.* 2012;44(4):495-507. DOI: 10.1017/S0021932011000721.
2. Бородина Д.И., Бородина Г.Н. Индексная оценка физического развития школьников 1 класса г. Барнаула (материалы VII итоговой науч.-практ. конф. НОМУИС (Барнаул, 23–25 мая 2022 г.)) // *Scientist.* 2022;22(4):103-106.
3. Kentesh O.P., Nemes M.I., Palamarchuk O.S. et al. Correction of autonomic dysfunction in young women by optimization of component body composition // *Wiad. Lek.* 2021;74(10(2)):2569-2574.
4. Watanabe T., Nagashima M., Hojo Y. Circadian rhythm of blood pressure in children with reference to normal and diseased children // *Acta Paediatr. Jpn.* 1994;36(6):683-689. DOI: 10.1111/j.1442-200x.1994.tb03270.x.
5. Вихрук Т.И., Пельшок Е.В. Физическое развитие военнослужащих, занимающихся гребным видом спорта // Итоговая научная конференция Военно-научного общества Военного института физической культуры за 2019 год: сборник статей. СПб.: Военный институт физической культуры, 2020. С. 60–62.
6. Миклашевская Н.Н., Соловьева В.С., Година Е.З. Ростовые процессы у детей и подростков. М.: Изд-во МГУ, 1988. 184 с.
7. Алексеев В.П., Дебет Г.Ф. Краниометрия: методика антропологических исследований. М.: Наука, 1964. 128 с.
8. Байбаков С.Е., Бахарева Н.С. Гендерновозрастные особенности морфометрической характеристики мозгового черепа детей периода первого детства // *Сеченовский вестник.* 2016;3(25):18-22.
9. Саливон И.И. Изменения физического типа населения Беларуси за последнее тысячелетие. Минск: Беларус. наука, 2011. 172 с.
10. Аминев Ф.Г., Файзуллина Л.Р., Полько Г.М. Здоровье физическое и социальное // Башкортостан – территория роста: предпринимательство, экология, язык и культура (проблемы, поиски, перспективы): сборник материалов Всерос. науч.-практ. конф. (с междунар. участием) (Сибай, 16–17 марта 2017 г.). Уфа, 2017. С. 196–198.

## REFERENCES

1. Kryst Ł., Kowal M., Woronkiewicz A. et al. Secular changes in height, body weight, body mass index and pubertal development in male children and adolescents in Krakow, Poland. *J. Biosoc. Sci.* 2012;44(4):495-507. DOI: 10.1017/S0021932011000721.
2. Borodina D.I., Borodina G.N. Index assessment of physical development of 1st grade students of Barnaul. Proceedings of the VII Concluding Research and Practice Conference of NOMUIS (Barnaul, May 23–25, 2022). *Scientist.* 2022;22(4):103-106. (In Russ.)
3. Kentesh O.P., Nemes M.I., Palamarchuk O.S. et al. Correction of autonomic dysfunction in young women by optimization of component body composition. *Wiad. Lek.* 2021;74(10(2)):2569-2574.
4. Watanabe T., Nagashima M., Hojo Y. Circadian rhythm of blood pressure in children with reference to normal and diseased children. *Acta Paediatr. Jpn.* 1994;36(6):683-689. DOI: 10.1111/j.1442-200x.1994.tb03270.x.
5. Vikhruk T.I., Pelyshok E.V. (2020). Physical development of military personnel involved in rowing. In *Concluding Scientific Conference of the Military Scientific Society of the Military Institute of Physical Culture for 2019: collection of articles*. St. Petersburg: Military Institute of Physical Culture. P. 60–62. (In Russ.)
6. Miklashevskaya N.N., Solovyova V.S., Godina E.Z. (1988). *Growth Processes in Children and Adolescents*. Moscow: MSU. 184 p. (In Russ.)
7. Alekseeva V.P., Debets G.F. (1964). *Craniometry: a Method of Anthropological Research*. Moscow: Nauka. 128 p. (In Russ.)
8. Baibakov S.E., Bakhareva N.S. Gender and age variation of cranial morphometric characteristics in pre-school age children. *Sechenov Medical Journal.* 2016;3(25):18-22. (In Russ.)
9. Salivon I.I. (2011). *Changes in the Physical Type of the Population of Belarus over the last Millennium*. Minsk: Belarus Nauka. 172 p. (In Russ.)
10. Aminev F.G., Faizullina L.R., Polko G.M. (2017). Physical and social health. In *Bashkortostan – a Territory of Growth: Entrepreneurship, Ecology, Language and Culture (Problems, Searches, Prospects): collection of articles of the All-Russian Research and Practice Conference (with international participation) (Sibay, March 16–17, 2017)*. Ufa. P. 196–198. (In Russ.)

11. Menéndez López-Mateos M.L., Carreño-Carreño J., Palma J.C. et al. Three-dimensional photographic analysis of the face in European adults from southern Spain with normal occlusion: reference anthropometric measurements // *BMC Oral Health*. 2019;19(1):196. DOI: 10.1186/s12903-019-0898-y.
12. Саттаров А.Э. Индексы телосложения и физическое развитие подростков и юношей, проживающих в высокогорной сельской и городской местности // *Современные проблемы науки и образования*. 2015;6:94.
13. Лобанов Ю.Ф. Основные физические и параклинические константы детского возраста: учебно-методическое пособие / под ред. А.М. Мальченко. Барнаул: Алтайский государственный медицинский университет, 1997. 112 с.
14. Сухарев А.Г. Здоровье и физическое воспитание детей и подростков. М., 1991.
15. Беляев А.А., Лебединский В.Ю., Лин-Бей Н.П. и др. Мониторинг физической подготовленности детского населения Иркутской области // *Опыт работы в субъектах РФ по осуществлению мониторинга состояния физического здоровья детей, подростков и молодежи: сборник научных трудов*. М., 2002. С. 81–91.
16. Пестряков А.П. Меотская археологическая культура – Монголо-татарское нашествие // *Большая российская энциклопедия: в 35 т. М., 2012. Т. 20. С. 755*.
11. Menéndez López-Mateos M.L., Carreño-Carreño J., Palma J.C. et al. Three-dimensional photographic analysis of the face in European adults from southern Spain with normal occlusion: reference anthropometric measurements. *BMC Oral Health*. 2019;19(1):196. DOI: 10.1186/s12903-019-0898-y.
12. Sattarov A.E. Constitution indexes and physical development of teenagers and juveniles living in the mountainous rural and urban areas. *Modern Problems of Science and Education*. 2015;6:94. (In Russ.)
13. Lobanov Yu.F., Malchenko A.M. (ed.) (1997). *Basic Physical and Paraclinical Constants of Childhood: teaching guide*. Barnaul: Altai State Medical University. 112 p. (In Russ.)
14. Sukharev A.G. (1991). *Health and Physical Education of Children and Adolescents*. Moscow. (In Russ.)
15. Belyaev A.A., Lebedinskiy V.Yu., Lin-Bey N.P. et al. (2002). Monitoring of the physical fitness of children in the Irkutsk region. In *Experience of Work in the Subjects of the Russian Federation on Monitoring the State of Physical Health of Children, Adolescents and Young People: collection of scientific papers*. Moscow. P. 81–91. (In Russ.)
16. Pestryakov A.P. (2012). Meotian archaeological culture – Mongol-Tatar invasion. In *The Great Russian Encyclopedia: in 35 vol*. Moscow. Vol. 20. P. 755. (In Russ.)

#### СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

**Мершалова Анастасия Александровна** – преподаватель кафедры анатомии человека им. акад. Ю.И. Бородина ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0003-1373-9632.

**Бородина Галина Николаевна** – д-р мед. наук, доцент, профессор кафедры анатомии ФГБОУ ВО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России, Барнаул, Россия. ORCID: 0000-0001-5786-8984.

**Литвинова Тамара Александровна** – д-р мед. наук, профессор кафедры анатомии человека им. акад. Ю.И. Бородина ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия.

**Елясин Павел Александрович** – канд. мед. наук, доцент, заведующий кафедрой анатомии человека им. акад. Ю.И. Бородина ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0003-2570-367X.

#### ABOUT THE AUTHORS

**Anastasia A. Mershalova** – Lecturer, Department of Human Anatomy named after academician Yu.I. Borodin, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0003-1373-9632.

**Galina N. Borodina** – Dr. Sci. (Med.), Associate Professor, Professor, Department of Anatomy, Altai State Medical University, Barnaul, Russia. ORCID: 0000-0001-5786-8984.

**Tamara A. Litvinova** – Dr. Sci. (Med.), Professor, Department of Human Anatomy named after academician Yu.I. Borodin, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia.

**Pavel A. Elyasin** – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Head, Department of Human Anatomy named after academician Yu.I. Borodin, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0003-2570-367X.

## Ультроструктурная оценка гепатотоксических эффектов пегилированной гиалуронидазы в экспериментах *in vitro*

А.М. Швецова<sup>1</sup>, М.А. Королев<sup>1</sup>, А.А. Чурин<sup>2</sup>, Н.А. Бондаренко<sup>1</sup>, Н.П. Богатова<sup>1</sup>,  
К.И. Ершов<sup>1,3</sup>, П.Г. Мадонов<sup>1,3</sup>, Ю.Р. Равилова<sup>3</sup>, С.В. Мишенина<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

<sup>2</sup>НИИ фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», Томск, Россия

<sup>3</sup>ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия

### АННОТАЦИЯ

**В е д е н и е .** Препараты тестикулярной гиалуронидазы имеют широкое применение в медицинской практике. Модификация нативных биологически активных молекул путем электронно-лучевого пегилирования позволяет усовершенствовать их фармакокинетические свойства, что обуславливает последующее улучшение фармакодинамических эффектов. Создание оригинального перорального лекарственного средства с фармакологически активным ядром, в качестве которого выступает гиалуронидаза, представляется перспективным, однако требует изучения безопасности применения на доклиническом этапе.

**Ц е л ь и с с л е д о в а н и я .** Ультроструктурная оценка гепатотоксических эффектов пегилированной гиалуронидазы *in vitro*.

**М а т е р и а л ы и м е т о д ы .** Объект исследования – пегилированная на полиэтиленоксиде посредством электронно-лучевого синтеза тестикулярная гиалуронидаза (ПЭГ-ГИАЛ). Культуральная среда – перевиваемая культура клеток печени человека Chanq liver. Оценка цитотоксического действия проводили с помощью МТТ-теста. Ультроструктурные изменения оценивали методом электронной микроскопии.

**Р е з у л ь т а т ы .** Разрабатываемое оригинальное лекарственное средство ПЭГ-ГИАЛ в изучаемых концентрациях 37, 75 и 150 ЕД/мл не оказывает цитотоксического воздействия на культуру клеток печени человека (гепатоциты). Жизнеспособность клеток находится практически на уровне контроля при воздействии ПЭГ-ГИАЛ в концентрациях 37 и 75 ЕД/мл, а под влиянием максимальной концентрации 150 ЕД/мл статистически значимо стимулируется пролиферация клеток, о чем свидетельствует повышение их жизнеспособности до 106 %. Результаты оценки ультроструктурных изменений гепатоцитов показали, что воздействие ПЭГ-ГИАЛ во всех концентрациях приводит к усилению обменных процессов в клетках, развитию аутофагии, которая является одним из основных гомеостатических процессов.

**З а к л ю ч е н и е .** Исследуемое лекарственное средство ПЭГ-ГИАЛ во всех изучаемых концентрациях не оказывает токсического воздействия на культуру гепатоцитов человека. Полученные результаты могут быть использованы при дальнейшем исследовании при разработке ПЭГ-ГИАЛ.

**Ключевые слова:** гиалуронидаза, пегилирование, цитотоксичность, культура клеток печени человека.

**Образец цитирования:** Швецова А.М., Королев М.А., Чурин А.А., Бондаренко Н.А., Богатова Н.П., Ершов К.И., Мадонов П.Г., Равилова Ю.Р., Мишенина С.В. Ультроструктурная оценка гепатотоксических эффектов пегилированной гиалуронидазы в экспериментах *in vitro* // Journal of Siberian Medical Sciences. 2024;8(3):51-61. DOI: 10.31549/2542-1174-2024-8-3-51-61

Поступила в редакцию 26.03.2024  
Прошла рецензирование 13.05.2024  
Принята к публикации 30.05.2024

Автор, ответственный за переписку  
Швецова Александра Михайловна: НИИ клинической и экспериментальной лимфологии – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН. 630060, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2.  
E-mail: aleksa-2904@mail.ru

Received 26.03.2024  
Revised 13.05.2024  
Accepted 30.05.2024

Corresponding author  
Shvetsova Alexandra M.: Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 2, Timakova str., Novosibirsk, 630060, Russia.  
E-mail: aleksa-2904@mail.ru

## Ultrastructural evaluation of hepatotoxic effects of PEGylated hyaluronidase *in vitro*

A.M. Shvetsova<sup>1</sup>, M.A. Korolev<sup>1</sup>, A.A. Churin<sup>2</sup>, N.A. Bondarenko<sup>1</sup>, N.P. Bgatova<sup>1</sup>, K.I. Ershov<sup>1,3</sup>, P.G. Madonov<sup>1,3</sup>, Yu.R. Raviлова<sup>3</sup>, S.V. Mishenina<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup>Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia

<sup>3</sup>Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia

### ABSTRACT

**I n t r o d u c t i o n .** Testicular hyaluronidase preparations are widely used in medical practice. Modification of native biologically active molecules by electron beam PEGylation allows to improve their pharmacokinetic properties, which determines a subsequent improvement of pharmacodynamic effects. The development of an original oral drug with a pharmacologically active core, which is hyaluronidase, is promising, but requires studying the safety of use at the pre-clinical stage.

**A i m .** Ultrastructural evaluation of hepatotoxic effects of PEGylated hyaluronidase *in vitro*.

**M a t e r i a l s a n d m e t h o d s .** The object of a study was testicular hyaluronidase PEGylated on polyethylene oxide (PEG-HYAL) using electron beam synthesis. The culture medium is a continuous culture of human liver cells Chang liver. The cytotoxic effect was detected by the MTT assay. Ultrastructural changes were evaluated by electron microscopy.

**R e s u l t s .** The original drug PEG-HYAL in the studied concentrations of 37, 75 and 150 U/ml has no cytotoxic effect on the human liver cell culture (hepatocytes). Cell viability is virtually at the control level when PEG-HYAL administration at concentrations of 37 and 75 U/ml, and in the maximum concentration of 150 U/ml, cell proliferation is stimulated significantly, as evidenced by an increase in cell viability up to 106%. The results of evaluation of ultrastructural changes in hepatocytes showed that exposure to PEG-HYAL in all concentrations leads to the enhancement of metabolic processes in cells, development of autophagy, which is one of the main homeostatic processes.

**C o n c l u s i o n .** The drug PEG-HYAL in all studied concentrations has no toxic effect on the human hepatocyte culture. The results obtained can be used in further research in the development of PEG-HYAL.

**Keywords:** hyaluronidase, PEGylation, cytotoxicity, human liver cell culture.

**Citation example:** Shvetsova A.M., Korolev M.A., Churin A.A., Bondarenko N.A., Bgatova N.P., Ershov K.I., Madonov P.G., Raviлова Yu.R., Mishenina S.V. Ultrastructural evaluation of hepatotoxic effects of PEGylated hyaluronidase *in vitro*. *Journal of Siberian Medical Sciences*. 2024;8(3):51-61. DOI: 10.31549/2542-1174-2024-8-3-51-61

### ВВЕДЕНИЕ

Гиалуронидаза является ферментом, который расщепляет гиалуроновую кислоту. При создании лекарственных препаратов энзимы проявляют ряд недостатков, среди которых низкая стабильность и биодоступность, повышенная способность вызывать различные аллергические реакции, в том числе со стороны иммунной системы. Обширные показания к применению препаратов на основе тестикулярной гиалуронидазы позволяют успешно использовать их в различных областях медицины на протяжении нескольких десятков лет. Однако многолетний опыт использования препаратов гиалуронидазы в качестве перспективного средства для лечения

### INTRODUCTION

Hyaluronidase is an enzyme that breaks down hyaluronic acid. When developing drugs, enzymes show several disadvantages, including low stability and bioavailability, increased ability to cause various allergic reactions, in particular from the immune system. A wide range of indications for the use of testicular hyaluronidase preparations allows their successful use in various fields of medicine for several decades. However, many years of experience in using hyaluronidase preparations as a promising drug for the treatment of several diseases has a disadvantage – lack of their oral forms because of low bioavailability in this route of administration. By modifying the active substance on a polymeric carrier by

ряда заболеваний имеет и недостаток – отсутствие у них пероральных форм ввиду низкой биодоступности при данном способе приема. Путем модификации активного вещества на полимерном носителе посредством электронно-лучевого воздействия можно получить конъюгат с устраненными негативными свойствами [1, 2]. Создание оригинального перорального лекарственного средства с фармакологически активным ядром, в качестве которого выступает гиалуронидаза, иммобилизованная на полиэтиленгликоле с помощью технологии электронно-лучевого синтеза, представляется нам весьма перспективным и требует изучения безопасности применения на доклиническом этапе [3].

Оценка токсичности лекарственных препаратов является неотъемлемой частью регистрационного досье, в частности цитотоксичность представляет собой отдельный этап при разработке нового лекарственного средства [4]. Анализ риска развития гепатотоксичности является важной составляющей доклинических исследований. Наиболее часто развитие нежелательных реакций со стороны органов желудочно-кишечного тракта при применении лекарств происходят именно в печени. Лекарственная гепатотоксичность выступает главенствующей из причин изъятия и отзыва препаратов [5]. В связи с тем, что печень – основной орган детоксикации и метаболических процессов, культуру клеток гепатоцитов можно использовать в качестве модели для токсикологических исследований лекарственных средств [6]. На доклиническом этапе исследования перспективным является проведение экспериментов именно на клеточных культурах. Клетки – первый уровень организации жизни, на котором можно провести оценку нарушений структуры внутриклеточных структурных компонентов, их взаимодействий, что в конечном итоге даст картину механизма повреждающего действия. Оценка цитотоксичности чаще всего используется в качестве скрининга для определения собственной токсичности вещества [7]. Эксперименты *in vitro* обладают рядом преимуществ наряду с простотой проведения, низкой стоимостью и большим запасом материала, что в последующем позволяет сократить численность экспериментов в ходе доклинических испытаний *in vivo*. Кроме того, исследование цитотоксичности на лабораторных животных *in vivo* бывают нерелевантны ввиду видоспецифичных различий с человеком [8].

electron beam exposure, a conjugate with eliminated negative properties can be obtained [1, 2]. Developing an original oral drug with a pharmacologically active core, which is hyaluronidase immobilized on polyethylene glycol (PEG) using electron beam synthesis technology, seems to us very promising and requires studying the safety of use at the preclinical stage [3].

Evaluation of drug toxicity is an integral part of the registration dossier, in particular, cytotoxicity assessment represents a separate stage in the development of a new drug [4]. Analysis of the risk of hepatotoxicity is an important part of preclinical studies. The most frequent of gastrointestinal adverse drug reactions occurs in the liver. Drug hepatotoxicity is the main reason for withdrawal and recall of drugs [5]. Because the liver is the main organ orchestrating the detoxification and metabolic processes, hepatocyte cell culture can be used as a model for toxicological studies of drugs [6]. At the preclinical stage of research, it is promising to conduct experiments on cell cultures. Cells are the first level of life organization, at which it is possible to assess the disorders in the structure of intracellular components, their interactions, which will finally reveal the mechanism of damage. Cytotoxicity assessment is most often used as screening to determine the proper toxicity of a substance [7]. *In vitro* experiments have several advantages along with ease of conducting, low cost and large stock of material, which subsequently allows for a reduction in the number of experiments during *in vivo* preclinical experiments. In addition, *in vivo* cytotoxicity studies on laboratory animals are not relevant because of species-specific differences with humans [8].

## AIM OF THE RESEARCH

To evaluate *in vitro* experiments on human cell culture (hepatocytes) the possible cytotoxic effect of PEGylated hyaluronidase as an original drug.

## MATERIALS AND METHODS

**Object of the research.** Hyaluronate-endo- $\beta$ -N-acetylhexosaminidase subjected to electron beam immobilization on a polymer carrier polyethylene oxide Macrogol-1500 (PEG-HYAL) by accelerated electron flow at a dose of 1.5 Mrad, which is created by a pulsed linear accelerator ILU-10 (Budker Institute of Nuclear Physics, Novosibirsk, Russia). PEG-HYAL was manufactured at the Siberian Center of Pharmacology and Biotechnology, JSC (Novosibirsk, Russia) and was kindly provided as part of scientific cooperation. PEG-HYAL was studied at concentrations of 37, 75 and 150 U/ml. These dosages, simulating the presence of PEG-HYAL in the

## ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценить в экспериментах *in vitro* на культуре гепатоцитов человека возможное цитотоксическое действие пегилированной гиалуронидазы, рассматриваемой в качестве оригинального лекарственного средства.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Объект исследования.** Гиалуронат-эндо- $\beta$ -N-ацетилгексозаминидаза, подвергнутая электронно-лучевой иммобилизации на полимерном носителе полиэтиленоксиде Макрогол-1500 (ПЭГ-ГИАЛ) потоком ускоренных электронов в дозе 1.5 Мрад, который создается импульсным линейным ускорителем ИЛУ-10 (Институт ядерной физики имени Г.И. Будкера СО РАН, Новосибирск, Россия). ПЭГ-ГИАЛ изготовлена в АО «Сибирский центр фармакологии и биотехнологии» (г. Новосибирск, Россия) и любезно предоставлена в рамках научного сотрудничества. ПЭГ-ГИАЛ изучали в концентрациях 37, 75 и 150 ЕД/мл. Данные дозировки, моделирующие нахождение ПЭГ-ГИАЛ в системном кровотоке, были рассчитаны с учетом объема циркулирующей крови лабораторных мышей. Степень чистоты препаратов > 97% (измерялась на жидкостном хроматографе Ackta Purifier 100, GE Healthcare).

**Культура клеток.** В эксперименте использовали перевиваемую культуру клеток печени человека Chanq liver (ФГБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Россия). Клетки печени Chanq liver культивировали в питательной среде RPMI-1640 (ООО «БиолоТ», Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (HyClone, US Origin), 40 мкг/мл гентамицина сульфата (ОАО «Дальхимфарм», Россия) и 2 ммоль L-глутамин (ICN, США) в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37 °C и 5% CO<sub>2</sub> до образования конфлюэнтного монослоя.

**Исследование цитотоксичности.** Эксперименты по изучению и оценке цитотоксичности проводили с использованием двух методов:

**MTT-тест** – данный метод позволяет определить жизнеспособность клеток. Основан на том, что живые и метаболически активные клетки с помощью митохондриальных дегидрогеназ преобразовывают желтую растворимую соль тетразолия (3[4,5-диметил-тиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия) и восстанавливают ее до фиолетовых нерастворимых кристаллов формазана. При лизисе клеток кристаллы формазана легко переходят в раствор органических растворите-

systemic circulation, were calculated taking into account the volume of circulating blood of laboratory mice. Pharmaceutical grade > 97% (measured using an Ackta Purifier 100 liquid chromatograph, GE Healthcare).

**Cell culture.** In the experiments, a continuous culture of human liver cells Chanq liver (State Scientific Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Russia) was used. Chanq liver cells were cultured in a RPMI-1640 medium (BioloT, LLC, Russia) with the addition of 10% fetal bovine serum (FBS) (HyClone, US Origin), 40  $\mu$ g/ml gentamicin sulfate (Dalkhimpharm, JSC, Russia) and 2 mmol L-glutamine (ICN, USA) in a CO<sub>2</sub> incubator at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> until a confluent monolayer is formed.

**Cytotoxicity study.** Experiments to study and evaluate cytotoxicity were carried out using two methods:

**MTT assay** – this method allows to determine the viability of cells. It is based on the fact that living and metabolically active cells, using mitochondrial dehydrogenases, convert the yellow soluble tetrazolium salt (3[4,5-dimethyl-thiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium) and reduce it to purple insoluble formazane crystals. During cell lysis, formazane crystals easily pass into a solution of organic solvents such as isopropanol or dimethyl sulfoxide. By measuring the absorbance of the formazane solution, the activity of mitochondrial dehydrogenases and, accordingly, cell viability are determined [9].

To determine the cytotoxicity of PEG-HYAL, cells were cultured in 96-well plates at the rate of  $2 \times 10^4$  cells per well. After 24 hours, the medium was removed, complete medium with 1% FBS and PEG-HYAL at concentrations of 37, 75 and 150 U/ml was added, and cells were cultured for 72 hours. After incubation of cells with drugs in a CO<sub>2</sub> incubator at 37°C, the culture medium was removed from the wells, 100  $\mu$ l of medium with MTT (3[4,5-dimethyl-thiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium, Sigma) was added at an initial concentration of 5 mg/ml and incubated for 4 hours. The absorption of dissolved formazane crystals was measured at a wavelength of 492 nm using a Stat Fax-2100 microplate reader (Awareness Technology Inc., USA) and expressed in units of absorbance (UA). Cell viability was calculated as the ratio of UA in the experiment  $\times 100$ /UA in the control.

Statistical analysis was performed using STATISTICA 10.0 software (StatSoft Inc., USA). The data are presented as the mean value (M) and standard deviation (SD). Significance of differences between the groups was assessed according to the Mann-Whitney

лей, таких как изопропанол или диметилсульфоксид. По измерению оптической плотности раствора формазана проводят определение активности митохондриальных дегидрогеназ и, соответственно, жизнеспособности клеток [9].

Для определения цитотоксичности ПЭГ-ГИАЛ клетки высевали в 96-луночные планшеты в количестве  $2 \times 10^4$  клеток на лунку. Через 24 ч культивирования среду удаляли, добавляли полную среду с 1% содержанием ЭТС и ПЭГ-ГИАЛ в концентрациях 37, 75 и 150 ЕД/мл, далее культивировали клетки в течение 72 ч. После инкубации клеток с препаратами в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе при 37 °С культуральную среду убирали из лунок, добавляли по 100 мкл среды с МТТ (3[4,5-диметил-тиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия, Sigma) в исходной концентрации 5 мг/мл и инкубировали в течение 4 ч. Поглощение растворенных кристаллов формазана измеряли при длине волны 492 нм с использованием планшетного ридера Stat Fax-2100 (Awareness Technology Inc., США) и выражали в единицах оптической плотности (ЕОП). Жизнеспособность клеток рассчитывали как отношение ЕОП в опыте  $\times 100$ /ЕОП в контроле.

Статистический анализ выполняли с использованием пакета программ STATISTICA 10.0 (StatSoft Inc., США). Данные представлены в виде среднего значения (M) и стандартного отклонения (SD). Достоверность различий между группами оценивали по критерию Манна – Уитни. Различия считались достоверными при  $p < 0.05$ .

**Электронно-микроскопическое исследование:** влияние ПЭГ-ГИАЛ на цитоархитектонику клеток оценивали визуально. Клетки фиксировали в 1% растворе  $\text{OsO}_4$  на фосфатном буфере (рН 7.4), дегидратировали в этиловом спирте возрастающей концентрации и заключали в эпон (Serva, Германия). Из полученных блоков готовили полутонкие срезы толщиной 1 мкм на ультратоме Leica UC7/FC7 (Германия/Швейцария), окрашивали толуидиновым синим, изучали под световым микроскопом LEICA DME и выбирали клетки для электронно-микроскопического исследования. Из отобранного материала получали ультратонкие срезы толщиной 70–100 нм, контрастировали насыщенным водным раствором уранилацетата и цитратом свинца и изучали с помощью электронного микроскопа JEM-1400 (JEOL, Япония) Центра коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов Сибирского отделения Российской академии наук (Новосибирск, Россия).

test. The differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

**Electron microscopic examination.** The effect of PEG-HYAL on the cytoarchitectonics of cells was assessed visually. The cells were fixed in a 1% solution of  $\text{OsO}_4$  using a phosphate buffer (pH 7.4), dehydrated in ethyl alcohol of increasing concentrations and enclosed in EPON (Serva, Germany). Semi-thin 1  $\mu\text{m}$  sections were prepared from the obtained blocks on a Leica UC7/FC7 ultramicrotome (Germany/Switzerland), stained with toluidine blue, studied on a LEICA DME light microscope, and cells were selected for electron microscopic examination. Ultrathin 70–100 nm sections were obtained from the selected samples, contrasted with a saturated aqueous solution of uranyl acetate and lead citrate, and studied using a JEM-1400 electron microscope (JEOL, Japan) of the Center for Collective Microscopic Analysis of Biological Objects of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (Novosibirsk, Russia).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Cytotoxicity assessment using MTT assay.

The viability of liver cells with the addition of PEG-HYAL at concentrations of 75 and 37 U/ml was at the control level – 99 and 100%, respectively. At the same time, the viability of liver cells in the maximum concentration of PEG-HYAL 150 U/ml significantly stimulated cell proliferation, as evidenced by an increase in cell viability up to 106%. This fact indicates the absence of a dose-dependent effect, as well as the cytotoxic effect of PEG-HYAL on human hepatocytes (Fig. 1).

**Electron microscopic examination.** Incubation of human liver cells, hepatocytes, with PEG-HYAL for 72 hours had some effect on the ultrastructural organization of cells.

Electron microscopic examination of intact hepatocytes revealed a small content of microvilli on the cell surface. In the cytoplasm of cells, rounded nuclei with a predominance of euchromatin and a nucleolus of granular fibrillar structure were observed. Mitochondria were more often oval or rounded in shape and had well-defined crystae. Glycogen in the form of rosettes was evenly distributed throughout the cytoplasm or formed clusters in certain areas of hepatocytes. Cisterns of the granular endoplasmic reticulum, peroxisomes and lysosomes were well represented. Single autolysosomes and lipid inclusions were found (Fig. 2, A and 3, A).

Ultrastructural analysis of hepatocytes cultured with PEG-HYAL at a dose of 37 U/ml revealed an increase in the electron density of cell cytoplasm and

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Оценка цитотоксичности с использованием МТТ-теста.** Жизнеспособность клеток печени при добавлении ПЭГ-ГИАЛ в концентрациях 75 и 37 ЕД/мл находилась на уровне контроля – 99 и 100 % соответственно. При этом жизнеспособность клеток печени под влиянием максимальной концентрации ПЭГ-ГИАЛ 150 ЕД/мл статистически значимо стимулировала пролиферацию клеток, о чем свидетельствует повышение жизнеспособности клеток до 106 %. Данный факт указывает на отсутствие дозозависимого эффекта, а также цитотоксического действия ПЭГ-ГИАЛ на гепатоциты человека (рис. 1).

**Электронно-микроскопическое исследование.** Инкубация клеток печени человека – гепатоцитов с ПЭГ-ГИАЛ в течение 72 ч оказала некоторое влияние на ультраструктурную организацию клеток.

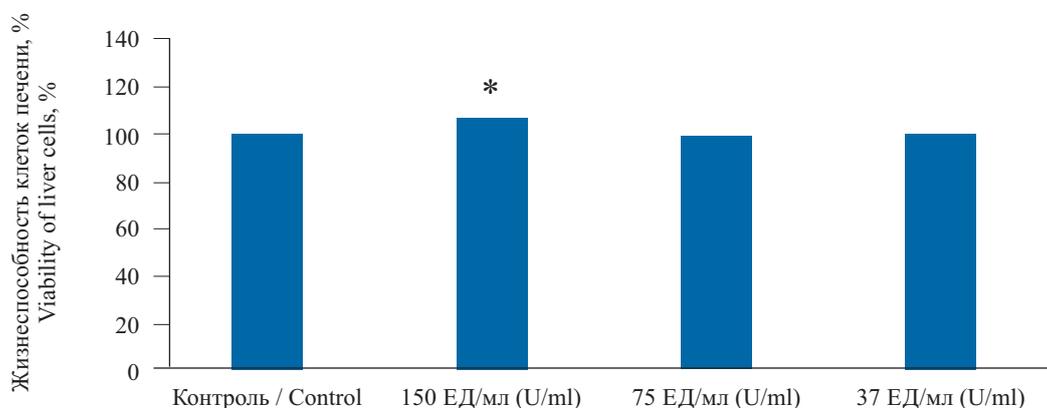
При электронно-микроскопическом исследовании интактных гепатоцитов отмечали небольшое содержание микроворсинок на поверхности клеток. В цитоплазме клеток наблюдали ядра округлой формы с преобладанием эухроматина и наличием ядрышка гранулярно-фибрилярного строения. Митохондрии имели чаще овальную или округлую форму и хорошо выраженные кристы. Гликоген в виде розеток располагался равномерно по цитоплазме или образовывал скопления в отдельных участках гепатоцитов. Были хорошо представлены цистерны гранулярного эндоплазматического ретикулума, пероксисомы и лизосомы. Встречались одиночные аутолизосомы и липидные включения и (рис. 2, А и 3, А).

При ультраструктурном анализе гепатоцитов, которые культивировали с ПЭГ-ГИАЛ в дозе

a significant increase in the size and number of microvilli on the surface of cells that were often in a budding state (Fig. 2, B). The size of the nucleoli was significantly increased. The cytoplasm of hepatocytes was abundant in organelles. Mitochondria had different shapes and sizes. An increase in the content of cristae and in the electron density of the matrix was noted (Fig. 3, B). A significant increase in the content of free polysomal complexes of ribosomes, autolysosomes and vesicular structures was observed (Fig. 2, B).

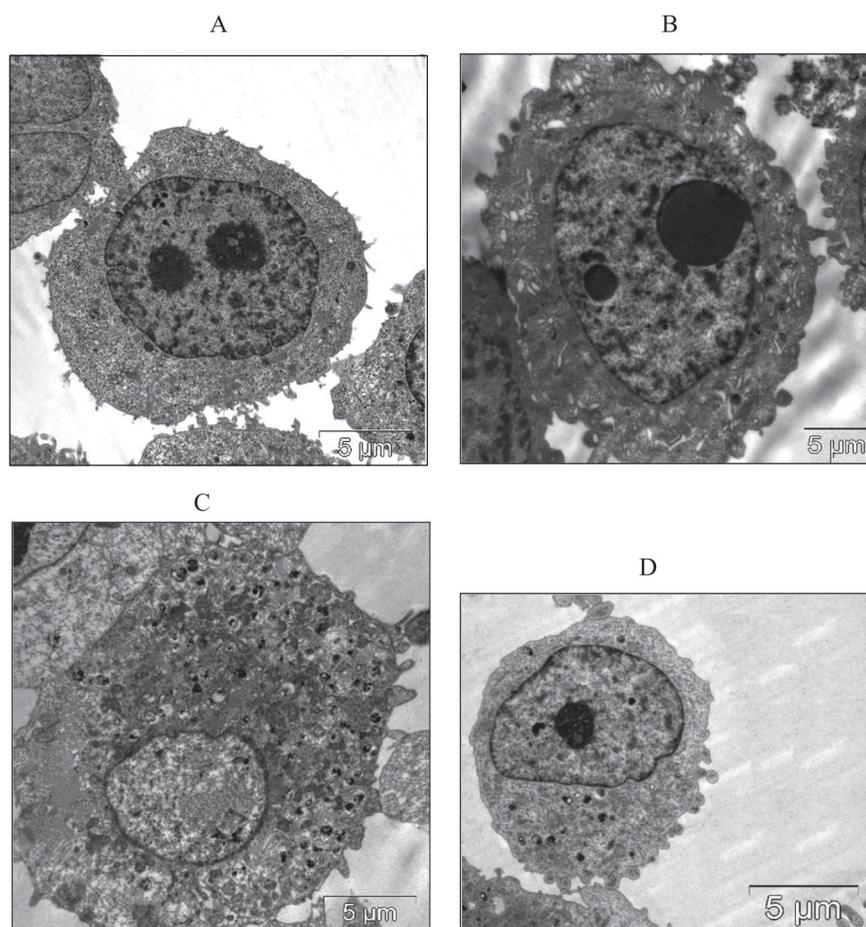
When culturing hepatocytes with PEG-HYAL at a dose of 75 U/ml, an increased content and size of microvilli on the cell surface were noted (Fig. 2, C). The electron density of the cytoplasm of cells and mitochondria was similar compared to the control. Mitochondria were arranged in groups, and most of them had clearly defined membrane boundaries with poorly visualized cristae. Well-defined cisterns of the granular endoplasmic reticulum and an increased content of free polysomal ribosome complexes were found. A significant accumulation of autophagosomes and autolysosomes was observed (Fig. 3, C).

When PEG-HYAL was added at a dose of 150 U/ml, numerous and enlarged microvilli on the cell surface were noted. Heterochromatin discrete masses were often observed in the structure of the nuclei, located throughout the whole organelle volume. Heterogeneity in the structure of mitochondria was noted, which had different sizes, shapes, electron density and content of cristae. An increased content of the cisterns of the granular endoplasmic reticulum, well-defined vacuoles of the Golgi complex, presence of small vesicular structures, moderate content of autophagosomes, autolysosomes and



**Рис. 1.** Жизнеспособность клеток печени под влиянием ПЭГ-ГИАЛ в различных концентрациях (\* достоверность различий в сравнении с контролем  $p = 0.04$ )

**Fig. 1.** Viability of liver cells in the use of PEG-HYAL in different concentrations (\* significance of differences compared with the control  $p = 0.04$ )



**Рис. 2.** Ультраструктура гепатоцитов при добавлении в культуральную среду ПЭГ-ГИАЛ в изучаемых дозах: А – контроль; В – ПЭГ-ГИАЛ в дозе 37 ЕД/мл; С – ПЭГ-ГИАЛ в дозе 75 ЕД/мл; D – ПЭГ-ГИАЛ в дозе 150 ЕД/мл  
**Fig. 2.** The ultrastructure of hepatocytes when PEG-HYAL is added to the culture medium in the studied doses: A – control; B – PEG-HYAL at a dose of 37 U/ml; C – PEG-HYAL at a dose of 75 U/ml; D – PEG-HYAL at a dose of 150 U/ml

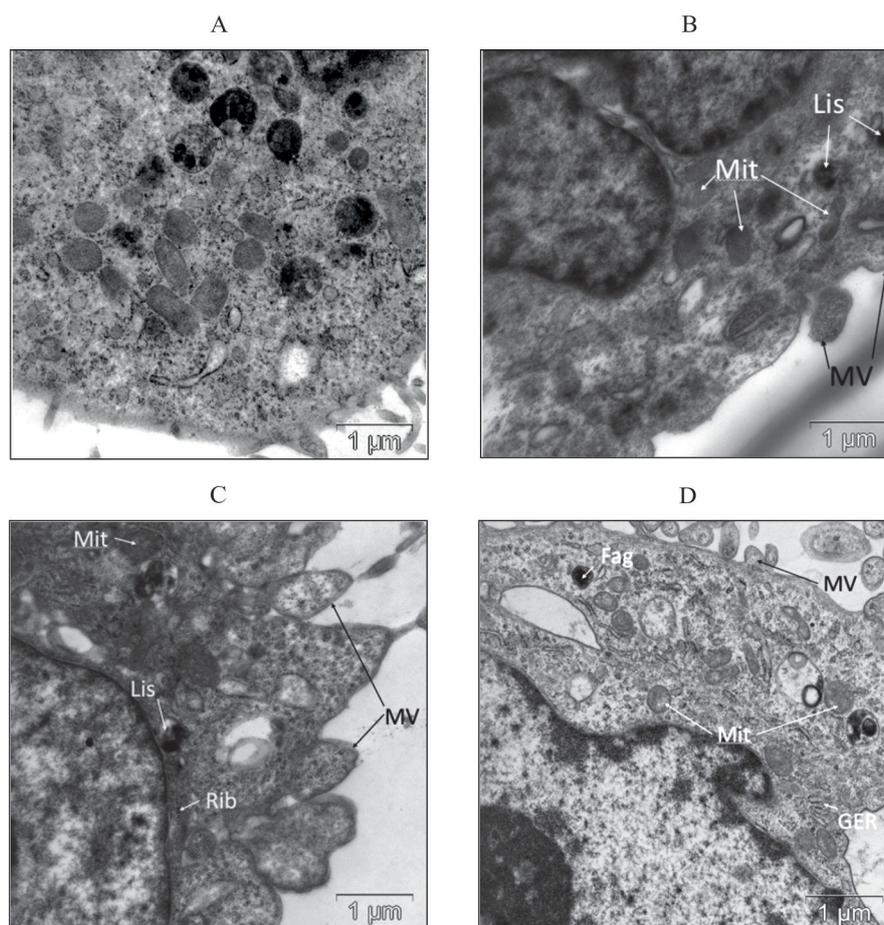
37 ЕД/мл, было выявлено увеличение электронной плотности цитоплазмы клеток и значительное возрастание размеров и содержания микроворсинок на поверхности клеток, которые часто находились в состоянии почкования (рис. 2, В). Были значительно увеличены размеры ядрышек. Цитоплазма гепатоцитов была насыщена органеллами. Митохондрии имели различные формы и размеры. Отмечали рост содержания крист и увеличение электронной плотности матрикса (рис. 3, В). Наблюдали значительное возрастание содержания свободных полисомальных комплексов рибосом, аутолизосом и везикулярных структур (рис. 2, В).

При культивировании гепатоцитов с ПЭГ-ГИАЛ в дозе 75 ЕД/мл отмечали повышенное содержание и увеличенные размеры микроворсинок на поверхности клеток (рис. 2, С). Электронная плотность цитоплазмы клеток и митохондрий была сходной с соответствующими

lysosomes, single lipid inclusions and a small content of glycogen granules were revealed (Fig. 2, D and 3, D).

The morphological examination data showed that the addition of PEG-HYAL to the culture medium in all studied doses led to an increase in the number and size of microvilli on the outer membrane of hepatocytes, in the content of protein synthesis structures of cells – free polysomal complexes of ribosomes or membranes of the granular endoplasmic reticulum; change in the shape, size, electron density and number of mitochondrial cristae, and also the content of autophagic structures.

The structural changes observed in hepatocytes during cultivation with PEG-HYAL indicate that in all doses the drug does not have a toxic effect and contributes to the enhancement of metabolic processes and the development of autophagy in cells as one of the main homeostatic processes. Activation of autophagy helps to maintain an adaptive cellular



**Рис. 3.** Ультраструктура и цитоархитектоника гепатоцитов при воздействии ПЭГ-ГИАЛ в изучаемых дозах (MV – микроворсинки; Mit – митохондрии; Lis – аутолизосомы; Fag – аутофагосомы; Rib – рибосомы; GER – гранулярный эндоплазматический ретикулум):

A – контроль; B – ПЭГ-ГИАЛ в дозе 37 ЕД/мл; C – ПЭГ-ГИАЛ в дозе 75 ЕД/мл; D – ПЭГ-ГИАЛ в дозе 150 ЕД/мл

**Fig. 3.** The ultrastructure and cytoarchitectonics of hepatocytes when PEG-HYAL is added in the studied doses (MV – microvilli; Mit – mitochondria; Lis – autolysosomes; Fag – autophagosomes; Rib – ribosomes; GER – granular endoplasmic reticulum):

A – control; B – PEG-HYAL at a dose of 37 U/ml; C – PEG-HYAL at a dose of 75 U/ml; D – PEG-HYAL at a dose of 150 U/ml

структурами в контроле. Митохондрии располагались группами, и большинство их имело четко очерченные границы мембран со слабо визуализируемыми кристами. Отмечали хорошо выраженные цистерны гранулярного эндоплазматического ретикулума и повышенное содержание свободных полисомальных комплексов рибосом. Наблюдали значительное накопление аутофагосом и аутолизосом (рис. 3, C).

При добавлении ПЭГ-ГИАЛ в дозе 150 ЕД/мл отмечали многочисленные и увеличенные в размере микроворсинки на поверхности клеток. В структуре ядер часто наблюдали глыбки гетерохроматина, расположенные по всему объему органеллы. Отмечали гетерогенность в структуре митохондрий, которые имели различные размеры, форму, электронную плотность и содержа-

response in changes of the intracellular and extracellular environment, protects the cell from the formation of cytotoxic components, and is also one of the mechanisms for overcoming possible stress reactions [10].

## CONCLUSION

As part of the experimental study, it was shown that PEG-HYAL does not have a cytotoxic effect on human hepatocytes. The studied concentrations of PEG-HYAL did not cause a cytodestructive effect. The data obtained can be used in the further development of PEG-HYAL as an original drug.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

ние крист. Выявляли повышенное содержание цистерн гранулярного эндоплазматического ретикулаума, хорошо выраженные вакуоли комплекса Гольджи, наличие мелких везикулярных структур, умеренное содержание аутофагосом, аутолизосом и лизосом, единичные липидные включения и небольшое содержание гранул гликогена (рис. 2, D и 3, D).

Полученные данные морфологического исследования показали, что добавление в культуральную среду ПЭГ-ГИАЛ во всех изучаемых дозах приводило к возрастанию содержания и размеров микроворсинок на наружной мембране гепатоцитов, увеличению содержания структур белкового синтеза клеток – свободных полисомальных комплексов рибосом или мембран гранулярного эндоплазматического ретикулаума, изменению формы, размеров, электронной плотности и содержания крист митохондрий, а также содержания аутофагических структур.

Наблюдаемые структурные изменения гепатоцитов при культивировании с ПЭГ-ГИАЛ свидетельствуют о том, что во всех изучаемых дозах средство не оказывает токсического дей-

ствия и способствует усилению обменных процессов и развитию аутофагии в клетках как одного из основных гомеостатических процессов. Активация аутофагии способствует поддержанию адаптивного клеточного ответа в условиях изменения внутри- и внеклеточной среды, защите клетки от образования цитотоксических компонентов, а также является одним из механизмов преодоления возможных стрессовых реакций [10].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках проведенного экспериментального исследования показано, что ПЭГ-ГИАЛ не оказывает цитотоксического воздействия на гепатоциты человека. Исследуемые концентрации ПЭГ-ГИАЛ не вызывали цитодеструктивного эффекта. Полученные данные можно использовать при дальнейшей разработке ПЭГ-ГИАЛ как оригинального лекарственного средства.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дыгай А.М., Зюзьков Г.Н., Жданов В.В. и др. Фармакологические свойства пегилированного с помощью нанотехнологии электронно-лучевого синтеза гранулоцитарного колониестимулирующего фактора // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2011;3(5):146-150.
2. Дыгай А.М., Зюзьков Г.Н., Жданов В.В. и др. Гепатопротекторные эффекты иммобилизованной с помощью нанотехнологии электронно-лучевого синтеза гиалуронидазы и механизмы их развития // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2011;151(1):86-90.
3. Артамонов А.В., Бекарев А.А., Верещагин Е.И. и др. Средство, увеличивающее резерв стволовых клеток в организме: Патент РФ № 2405822; опубл. 10.12.2010.
4. Данченко Е.О. Оценка цитотоксичности фармацевтических субстанций с использованием клеточных культур // Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2012;2:22-31.
5. Onakpoya I.J., Heneghan C.J., Aronson J.K. Post-marketing withdrawal of 462 medicinal products because of adverse drug reactions: a systematic review of the world literature // BMC Med. 2016;14:10. DOI: 10.1186/s12916-016-0553-2.
6. Бгатова Н.П., Досымбекова Р.С., Таскаева Ю.С. и др. Аутофагия как маркер жизнеобеспечения изолированных гепатоцитов // Морфология. 2021;159(1):5-12. DOI: 10.17816/1026-3543-2021-159-1-5-12.
7. Мазеркина И.А. Оценка лекарственной гепатотоксичности in vitro на клеточных моделях (обзор) // Безопасность и риск фармакотерапии.

## REFERENCES

1. Dygai A.M., Zyuz'kov G.N., Zhdanov V.V. et al. Pharmacological properties of granulocytic colony-stimulating factor pegylated using electron beam synthesis nanotechnologies. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2011;152:133-137. DOI: 10.1007/s10517-011-1472-z.
2. Dygai A.M., Zyuzkov G.N., Zhdanov V.V. et al. Mechanism for hepatoprotective effects of hyaluronidase immobilized by the nanotechnology method of electron beam synthesis. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2011;151(1):74-78. DOI: 10.1007/s10517-011-1263-6.
3. Artamonov A.V., Bekarev A.A., Vereshchagin E.I. et al. A product that increases the reserve of stem cells in the body. RF Patent No. 2405822. Published: 10.12.2010. (In Russ.)
4. Danchenko E.O. Evaluation of cytotoxicity of pharmaceutical substances with cell cultures. *Immunopathology, allergology, infectology*. 2012;2:22-31. (In Russ.)
5. Onakpoya I.J., Heneghan C.J., Aronson J.K. Post-marketing withdrawal of 462 medicinal products because of adverse drug reactions: a systematic review of the world literature. *BMC Med*. 2016;14:10. DOI: 10.1186/s12916-016-0553-2.
6. Bgatova N.P., Dosymbekova R.S., Taskaeva Y.S. et al. Autophagy as a life support marker of isolated hepatocytes. *Morphology*. 2021;159(1):5-12. DOI: 10.17816/1026-3543-2021-159-1-5-12. (In Russ.)
7. Mazerkina I.A. *In vitro* assessment of drug-induced liver injury using cell-based models: a review. *Safety and Risk of Pharmacotherapy*. 2023;11(2):131-144. DOI: 10.30895/2312-7821-2023-11-2-351. (In Russ.)

- 2023;11(2):131-144. DOI: 10.30895/2312-7821-2023-11-2-351.
8. Довнар А.Г., Свирчевская Е.Ю., Ржеусский С.Э., Самойлович Е.О. Оценка цитотоксичности субстанции повияргол *in vitro* // Медицинские новости. 2016;9:62-64.
  9. Методы исследования цитотоксичности при скрининге лекарственных препаратов: учебно-методическое пособие к практическим занятиям по курсу «Методы скрининга физиологически активных веществ» / А.Г. Иксанова, О.В. Бондарь, К.В. Балакин. Казань: Казанский университет, 2016. 40 с.
  10. Пупышев А.Б. Репаративная аутофагия и аутофаговая гибель клетки. Функциональные и регуляторные аспекты // Цитология. 2014;56(3):179-196.
  8. Dounar H.G., Svircheuskaya E.Y., Rzheussky S.E., Samailovich E.O. Cytotoxicity assessment of poviargol substance *in vitro*. *Meditsinskie novosti*. 2016;9:62-64. (In Russ.)
  9. Iksanova A.G., Bondar O.V., Balakin K.V. (2016). *Methods of Cytotoxicity Research in Drug Screening: a teaching guide to practical classes for the course "Methods of screening physiologically active substances"*. Kazan: Kazan University. 40 p. (In Russ.)
  10. Pupyshv A.B. Reparative autophagy and autophagy death of cells. Functional and regulatory aspects. *Tsitologiya*. 2014;56(3):179-196. (In Russ.)

## ABOUT THE AUTHORS

**Alexandra M. Shvetsova** – Junior Researcher, Laboratory of Experimental and Clinical Pharmacology, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0009-0002-7735-6032.

**Maxim A. Korolev** – Dr. Sci. (Med.), Head, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0002-0471-652X.

**Alexey A. Churin** – Dr. Sci. (Med.), Chief Researcher, Head, Department of Drug Toxicology, Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia. ORCID: 0000-0002-6088-7286.

**Natalia A. Bondarenko** – Cand. Sci. (Bio.), Head, Laboratory of Experimental and Clinical Pharmacology, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0002-8443-656X.

**Natalia P. Bgatova** – Dr. Sci. (Bio.), Professor, Head, Laboratory of Ultrastructural Studies, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0002-4507-093X.

**Konstantin I. Ershov** – Cand. Sci. (Bio.), Associate Professor, Department of Pharmacology, Clinical Pharmacology and Evidence-Based Medicine, Novosibirsk State Medical University; Senior Researcher, Laboratory of Pharmaceutical Technology, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0003-41399-036X.

**Pavel G. Madonov** – Dr. Sci. (Med.), Associate Professor, Head, Department of Pharmacology, Clinical Pharmacology and Evidence-Based Medicine, Novosibirsk State Medical University; Head, Department of Experimental Pharmacology, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0002-1093-8938.

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

**Швецова Александра Михайловна** – младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной и клинической фармакологии Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии – филиала ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия. ORCID: 0009-0002-7735-6032.

**Королев Максим Александрович** – д-р мед. наук, руководитель Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии – филиала ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0002-0471-652X.

**Чурин Алексей Александрович** – д-р мед. наук, главный научный сотрудник, заведующий отделом лекарственной токсикологии НИИ фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», Томск, Россия. ORCID: 0000-0002-6088-7286.

**Бондаренко Наталья Анатольевна** – канд. биол. наук, заведующий лабораторией экспериментальной и клинической фармакологии Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии – филиала ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0002-8443-656X.

**Бгатова Наталия Петровна** – д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией ультраструктурных исследований Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии – филиала ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0002-4507-093X

**Ершов Константин Игоревич** – канд. биол. наук, доцент кафедры фармакологии, клинической фар-

макологии и доказательной медицины ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России; старший научный сотрудник лаборатории фармацевтических технологий Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии – филиала ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0003-41399-036x.

**Мадонов Павел Геннадьевич** – д-р мед. наук, доцент, заведующий кафедрой фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России; руководитель отдела экспериментальной фармакологии Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии – филиала ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0002-1093-8938.

**Равилова Юлия Равильевна** – канд. мед. наук, доцент кафедры фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0002-4611-165X.

**Мишенина Светлана Владимировна** – д-р мед. наук, профессор кафедры фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0001-8377-7648.

**Yulia R. Ravilova** – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Department of Pharmacology, Clinical Pharmacology and Evidence-Based Medicine, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0002-4611-165X.

**Svetlana V. Mishenina** – Dr. Sci. (Med.), Professor, Department of Pharmacology, Clinical Pharmacology and Evidence-Based Medicine, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0001-8377-7648.



## Морфологическое исследование экспрессии эстрогена и прогестерона в миометрии мышей во время беременности и позднем послеродовом периоде при остром токсическом гепатозе и в условиях коррекции иммобилизированной гиалуронидазой

К.А. Кошлич, А.П. Надеев, П.Г. Мадонов, К.И. Ершов, Т.А. Агеева, Т.Г. Чернова, З.В. Бакуменко

ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия

### АННОТАЦИЯ

**В в е д е н и е .** Баланс эстрогенов и прогестерона обеспечивает гармоничное развитие матки в процессе беременности: прогестерон способствует увеличению числа миоцитов, а эстрогены – их объема. Гормональный баланс, достигнутый за счет катаболизма эстрогенов в печени, играет важную роль в послеродовой инволюции матки. В этой связи заболевания печени при беременности могут нарушить выведение эстрогенов, что ведет к гиперэстрогении и проблемам с поддержанием беременности, а также может вызвать нарушение послеродовой инволюции матки.

**Ц е л ь .** Изучение экспрессии рецепторов эстрогенов и прогестерона в миометрии мышей линии C57Bl/6 в условиях острого CCl<sub>4</sub>-индуцированного гепатоза во время беременности и позднем послеродовом периоде и при коррекции иммобилизированной гиалуронидазой (ИГ).

**М а т е р и а л ы и м е т о д ы .** Эксперимент проведен на 100 мышах-самках линии C57Bl/6. Острый гепатоз индуцировали на 13-е сутки беременности путем однократного внутрибрюшинного введения 50% раствора тетрахлорметана на оливковом масле в дозе 0,3 мл/кг. Мыши были разделены на четыре группы: 1-я (контрольная) группа – мыши с физиологической беременностью; 2-я группа включала мышей с острым токсическим гепатозом; 3-я группа – беременные мыши с индуцированным острым токсическим гепатозом и его коррекцией ИГ на 14-е сутки беременности; 4-я группа – мыши с физиологической беременностью и введением на 14-е сутки беременности ИГ. Во всех группах забор материала проводили на 18 и 21-й день беременности и на 1, 10 и 15-й день после родов. Подсчитывали численную плотность (Nai) в тестовой площади положительно окрашенных рецепторных ядер в миоцитах, независимо от интенсивности окрашивания.

**Р е з у л ь т а т ы .** Во время беременности при остром CCl<sub>4</sub>-индуцированном гепатозе экспрессия рецепторов прогестерона и эстрогена в миометрии не изменяется и соответствует таковой у мышей с физиологически развивающейся беременностью. У животных с острым CCl<sub>4</sub>-индуцированным гепатозом в поздний послеродовой период (до 15 сут) отмечается повышенная экспрессия рецепторов эстрогенов в миометрии, при относительно стабильных показателях экспрессии прогестерона. При коррекции острого CCl<sub>4</sub>-индуцированного гепатоза ИГ показатели количества экспрессии рецепторов к эстрогену в послеродовой период снижаются и в целом соответствуют аналогичным показателям мышей с физиологически развивающейся беременностью.

**З а к л ю ч е н и е .** При остром CCl<sub>4</sub>-индуцированном гепатозе нарушается баланс эстрогенов и прогестерона в миометрии в послеродовой период. При коррекции острого CCl<sub>4</sub>-индуцированного гепатоза ИГ показатели экспрессии рецепторов к эстрогену и прогестерону в миометрии нормализуются, что способствует завершению послеродовой инволюции матки.

**Ключевые слова:** экспрессия эстрогена и прогестерона, миометрий, беременность, послеродовая инволюция, токсический гепатоз, мыши.

**Образец цитирования:** Кошлич К.А., Надеев А.П., Мадонов П.Г., Ершов К.И., Агеева Т.А., Чернова Т.Г., Бакуменко З.В. Морфологическое исследование экспрессии эстрогена и прогестерона в миометрии мышей во время беременности и позднем послеродовом периоде при остром токсическом гепатозе и в условиях коррекции иммобилизированной гиалуронидазой // Journal of Siberian Medical Sciences. 2024;8(3):62-76. DOI: 10.31549/2542-1174-2024-8-3-62-76

Поступила в редакцию 30.07.2024  
Прошла рецензирование 20.08.2024  
Принята к публикации 10.09.2024

Автор, ответственный за переписку  
Надеев Александр Петрович: ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России. 630091, г. Новосибирск, Красный просп., 52.  
E-mail: nadeevngma@mail.ru

Received 30.07.2024  
Revised 20.08.2024  
Accepted 10.09.2024

Corresponding author  
Alexander P. Nadeev: Novosibirsk State Medical University, 52, Krasny prosp., Novosibirsk, 630091, Russia.  
E-mail: nadeevngma@mail.ru

## Morphological study of estrogen and progesterone expression in the myometrium of mice during pregnancy and the late postpartum period in acute toxic hepatitis and its correction with immobilized hyaluronidase

K.A. Koshlich, A.P. Nadeev, P.G. Madonov, K.I. Ershov, T.A. Ageeva, T.G. Chernova, Z.V. Bakumenko

Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia

### ABSTRACT

**I n t r o d u c t i o n .** The balance of estrogens and progesterone ensures the harmonious development of the uterus during pregnancy: progesterone provides an increase in the number of myocytes, and estrogens – their volume. Hormonal balance achieved through the catabolism of estrogens in the liver plays an important role in postpartum uterine involution. In this regard, liver diseases during pregnancy can disturb the elimination of estrogens, which leads to hyperestrogenism and problems with maintenance of pregnancy, and can also cause impaired uterine postpartum involution.

**A i m .** The study of the expression of estrogen and progesterone receptors in the myometrium of C57Bl/6 mice during pregnancy and the late postpartum period in acute CCl<sub>4</sub>-induced hepatitis and in its correction with immobilized hyaluronidase (IH).

**M a t e r i a l s a n d m e t h o d s .** The experiment was performed on 100 female C57Bl/6 mice. Acute hepatitis was induced on the 13th day of pregnancy by a single intraperitoneal injection of a 50% carbon tetrachloride solution in olive oil at a dose of 0.3 ml/kg. The mice were divided into four groups: group 1 (control) – intact pregnant mice; group 2 – mice with acute toxic hepatitis; group 3 – pregnant mice with induced acute toxic hepatitis and its correction with IH on the 14th day of pregnancy; group 4 – intact pregnant mice receiving IH on the 14th day of pregnancy. In all groups, sampling was carried out on the 18th and 21st days of pregnancy and on the 1st, 10th and 15th days after parturition. The numerical density (Nai) of positively stained nuclei of the receptors in the test area in myocytes was calculated, regardless of the staining intensity.

**R e s u l t s .** During pregnancy in acute CCl<sub>4</sub>-induced hepatitis, the expression of progesterone and estrogen receptors in the myometrium does not change and corresponds to that of intact pregnant mice. In animals with acute CCl<sub>4</sub>-induced hepatitis, in the late postpartum period (up to 15 days), an increased expression of estrogen receptors in the myometrium is noted, with relatively stable expression rates of progesterone. In the correction of acute CCl<sub>4</sub>-induced hepatitis with IH, the expression of estrogen receptors in the postpartum period decreases and generally corresponds to similar indicators in intact pregnant mice.

**C o n c l u s i o n .** In acute CCl<sub>4</sub>-induced hepatitis, the balance of estrogen and progesterone receptors in the myometrium in the postpartum period is disturbed. In the correction of acute CCl<sub>4</sub>-induced hepatitis with IH, the levels of expression of estrogen and progesterone receptors in the myometrium are normalized which contributes to the completion of postpartum uterine involution.

**Keywords:** estrogen and progesterone expression, myometrium, pregnancy, postpartum involution, toxic hepatitis, mice.

**Citation example:** Koshlich K.A., Nadeev A.P., Madonov P.G., Ershov K.I., Ageeva T.A., Chernova T.G., Bakumenko Z.V. Morphological study of estrogen and progesterone expression in the myometrium of mice during pregnancy and the late postpartum period in acute toxic hepatitis and its correction with immobilized hyaluronidase. *Journal of Siberian Medical Sciences*. 2024;8(3):62-76. DOI: 10.31549/2542-1174-2024-8-3-62-76

### ВВЕДЕНИЕ

Матка в процессе беременности, родов и в послеродовом периоде подвергается значительным морфофункциональным изменениям, которые затрагивают как эндометрий, так и миометрий. Если процессы трансформации эндометрия при беременности и в послеродовой период изучены достаточно подробно [1], то процессы,

### INTRODUCTION

During pregnancy, childbirth and the postpartum period, the uterus undergoes significant morphofunctional changes wherein both the endometrium and myometrium are involved. While the processes of endometrial transformation during pregnancy and the postpartum period have been studied well [1], the processes in the myometrium during pregnancy and

происходящие в миометрии во время беременности и в послеродовом периоде, до сих пор остаются недостаточно изученными и противоречивыми. Основным механизмом увеличения массы матки в первой половине беременности является гиперплазия миоцитов, во второй половине – гипертрофия миоцитов [1, 2]. В послеродовом периоде основными процессами, обеспечивающими инволюцию матки, являются клазмацитоз, апоптоз, некроз и аутофагия [2]. Все механизмы преобразования миометрия регулируются и зависят от ряда таких факторов, как уровень половых стероидных гормонов, их соотношение, состояние рецепторного аппарата миометрия, развивающаяся гипоксия во время родов при сдавлении сосудов и др. [3–5].

В настоящее время заболевания печени у беременных встречаются довольно часто и могут иметь множество причин. Патология печени может не быть связанной с беременностью, а возникнуть на ее фоне. К числу хронических или возникающих вне беременности заболеваний печени относятся вирусные гепатиты, алкогольная болезнь (алкогольный гепатоз/гепатит), цирроз печени и медикаментозные гепатиты [6]. Однако есть ряд заболеваний, непосредственно связанных с беременностью, являющихся ее осложнением, таких как HELLP-синдром, внутрипеченочный холестаза, преэклампсия и острый жировой гепатоз беременных [7, 8]. Независимо от причины этих состояний, они увеличивают показатели материнской и перинатальной смертности.

Процессы развития беременности, родов и послеродового периода регулируются половыми гормонами – эстрогенами и прогестероном.

Предшественником для синтеза половых гормонов (эстрадиола, эстрона, эстриола и прогестерона) является холестерин [9, 10]. В ходе преобразований из холестерина образуется андростендион, который потом может преобразоваться в тестостерон и далее в эстрадиол или напрямую в эстрон с последующим превращением в эстрадиол. Большая часть эстрадиола у женщин вырабатывается в яичниках из ароматизованного андростендиона. Эстрон синтезируется в жировой ткани из андрогенов с помощью ферментов, в первую очередь ароматазы. Эстриол – основной гормон беременности – производится в плаценте из предшественников, образующихся в печени и надпочечниках плода, таких как дегидроэпиандростеронсульфат (DHEA-S).

Прогестерон, вырабатываемый желтым телом, подготавливает эндометрий к импланта-

the postpartum period still remain insufficiently investigated and contradictory. The main mechanism of uterine weight gain in the early pregnancy is myocyte hyperplasia, and in late – myocyte hypertrophy [1, 2]. In the postpartum period, the main processes that ensure uterine involution are clasmacytosis, apoptosis, necrosis and autophagy [2]. All mechanisms of myometrium transformation are regulated by and depend on a number of factors such as the level of sex steroid hormones, their ratio, the state of the myometrial receptor system, intrapartum hypoxia due to vascular compression, etc. [3–5].

Currently, liver diseases in pregnant women are most common and can have many causes. Liver pathology may not be related to pregnancy, but may develop during pregnancy. Chronic liver diseases or non-pregnancy-associated liver diseases include viral hepatitis, alcoholic liver disease (alcoholic hepatitis/hepatitis), liver cirrhosis, and drug-induced hepatitis [6]. However, there are a number of diseases associated with pregnancy in a direct manner, which are its complications, such as the HELLP syndrome, intrahepatic cholestasis, preeclampsia, and acute fatty hepatitis of pregnancy [7, 8]. Regardless of the cause of these conditions, they increase maternal and perinatal mortality rates.

The pregnancy progression, process of childbirth and the postpartum period are regulated by sex hormones – estrogens and progesterone.

The precursor for the synthesis of sex hormones (estradiol, estrone, estriol and progesterone) is cholesterol [9, 10]. During its transformations, androstenedione is formed, which can then be converted into testosterone and then into estradiol or directly into estrone with subsequent conversion into estradiol. The most of estradiol in women is produced in the ovaries from androstenedione aromatization. Estrone is synthesized in adipose tissue from androgens with enzymes, primarily aromatase. Estriol, the main hormone in pregnancy, is synthesized in the placenta from precursors originated in the liver and adrenal glands of the fetus, such as dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S).

Progesterone produced by the corpus luteum prepares the endometrium for implantation of the fertilized ovum [9]. Also, one of the most important functions of progesterone during pregnancy is the development of maternal-fetal immune tolerance [11]. Cholesterol is converted to progesterone through a series of steps including double oxidation and loss of a side chain, transformation of pregnenolone into progesterone with the participation of enzymes such as  $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase and  $\delta 5$ -4-isomerase [12, 13].

ции оплодотворенной яйцеклетки [9]. Также одна из наиболее важных функций прогестерона во время беременности – развитие иммунологической толерантности матери к плоду [11]. Холестерин преобразуется в прогестерон через ряд этапов, включающих двойное окисление и потерю боковой цепи, трансформацию прегненолона в прогестерон с участием ферментов, таких как  $\beta$ -гидроксистероиддегидрогеназа и  $\delta$ 5-4-изомераза [12, 13].

Эстрогены в период беременности синтезируются из комплекса «плацента – плод» и преобразуются в эстриол, который поддерживает маточно-плацентарный кровоток и сердечно-сосудистую систему женщины, усиливая сердечный выброс и продукцию альдостерона [10]. Непосредственно перед родами уровень эстрогенов поднимается, вызывая сокращения миометрия и координацию родовой деятельности. Прогестерон же в течение беременности снижает маточный тонус и имеет иммунную функцию [13]. В конце беременности уровень этого гормона падает, что приводит к противоположным эффектам.

Согласованное действие эстрогенов и прогестерона обеспечивает гармоничное развитие матки в процессе роста плода: прогестерон способствует увеличению числа миоцитов, а эстрогены – их объема [12, 13]. Гормональный баланс, достигнутый за счет катаболизма эстрогенов в печени, играет важную роль. Известно, что печень является центральным органом гомеостазирования, нарушение ее функции влечет за собой ряд изменений, затрагивающих в том числе метаболизм половых стероидных гормонов, которые, как общепринято, являются главными регуляторами экспрессии ядерных рецепторов [11, 14]. В этой связи оценка уровня экспрессии рецепторов к эстрогену и прогестерону позволит исследовать состояние рецепторного аппарата миометрия в условиях патологии печени и изучить ее роль в механизмах послеродовой инволюции миометрия. Заболевания печени могут нарушить выведение эстрогенов, что ведет к гиперэстрогении и проблемам с зачатием, поддержанием беременности, а также вызвать прерывание беременности или преждевременные роды [10, 15, 16].

Применение большинства препаратов-гепатопротекторов у беременных с заболеваниями печени ограничено, поэтому в настоящее время ведется поиск эффективных лекарственных средств для лечения без риска для здоровья матери и плода. В области репаративной меди-

During pregnancy, estrogens are synthesized from the fetoplacental unit and converted into estriol, which maintains the uteroplacental blood flow and the female cardiovascular system, increasing cardiac output and aldosterone production [10]. Immediately before delivery, the estrogen level elevates, causing contractions of the myometrium and coordinating the labor. Progesterone during pregnancy reduces uterine tone and has an immune function [13]. At the end of pregnancy, the level of this hormone falls, which leads to opposite effects.

The coordinated action of estrogens and progesterone ensures the harmonious development of the uterus during fetal growth: progesterone promotes an increase in the number of myocytes, and estrogens – their volume [12, 13]. The hormonal balance achieved through estrogen catabolism in the liver plays an important role. It is known that the liver is the pivotal organ involved in homeostasis, and its dysfunction entails a number of changes, including those affecting the metabolism of sex steroid hormones, which are the commonly-accepted basic regulators of the expression of nuclear receptors [11, 14]. In this regard, assessing the level of expression of estrogen and progesterone receptors will allow to investigate the state of the myometrial receptor system in liver pathology and to study its role in the mechanisms of postpartum involution of the myometrium. Liver diseases can disturb the estrogen elimination, leading to hyperestrogenism and problems with conception, maintaining pregnancy, and causing termination of pregnancy or preterm birth as well [10, 15, 16].

The use of most hepatoprotective drugs in pregnant women with liver diseases is limited, so, currently, there is a search for effective drugs for risk-free maternal-fetal treatment. In the field of reparative medicine, active study is being conducted of drugs obtained by pharmacological stimulation of endogenous stem cells of the body, which include immobilized hyaluronidase (IH) [17].

## AIM OF THE RESEARCH

To study the expression of estrogen and progesterone receptors in the myometrium of C57Bl/6 mice during pregnancy and the late postpartum period in acute  $\text{CCl}_4$ -induced hepatitis and its correction with IH.

## MATERIALS AND METHODS

The experiment was performed on 100 female C57Bl/6 mice, 2 months old and weighing 20–22 g. The mice were obtained from the vivarium of the Federal Research Center Institute of Cytology and

цины проводится активное изучение препаратов, получаемых путем фармакологической стимуляции эндогенных стволовых клеток организма, к которым и относится иммобилизованная гиалуронидаза (ИГ) [17].

## ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучить экспрессию рецепторов эстрогенов и прогестерона в миометрии мышей линии С57Bl/6 в условиях острого  $\text{CCl}_4$ -индуцированного гепатоза во время беременности и позднем послеродовом периоде и при коррекции ИГ.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент проведен на 100 мышах-самках линии С57Bl/6 2-месячного возраста массой 20–22 г. Мыши были получены из вивария ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН» (Новосибирск). Животных помещали в пластмассовые клетки по 5 особей (один самец и четыре самки) и содержали в стандартных условиях с неограниченным доступом к пище и воде. Беременность у самок фиксировалась с момента обнаружения во влагалище копулятивной пробки.

Острый гепатоз индуцировали на 13-е сутки беременности путем однократного внутрибрюшинного введения 50% раствора тетрахлорметана на оливковом масле в дозе 0.3 мл/кг.

Коррекцию острого гепатоза проводили с 14–15-х суток беременности (на следующие сутки после введения тетрахлорметана) в течение 5 дней, однократным внутрибрюшинным введением препарата ИГ в дозировке 1 ЕД на мышь (всего 5 ЕД). Использовался препарат ИГ, модифицированной активированным полиэтиленоксидом молекулярной массой 1500 Да с помощью электронно-лучевого синтеза, разработанный ООО «Саентифик фьючер менеджмент» (Новосибирск) и НИИ фармакологии СО РАН (Томск). Выбор в качестве корректирующего средства ИГ обусловлено его фармакологическими эффектами, заключающимися в значительной стимуляции процессов пролиферации и дифференцировки как регионарных стволовых клеток печени, так и прогениторных клеток костного мозга [17]. Показано, что введение ИГ крысам с  $\text{CCl}_4$ -индуцированным гепатитом оказывало противовоспалительное, антисклеротическое и антихолестатическое действие [18, 19].

Мыши были разделены на четыре группы: 1-я (интактная) группа (25 животных) – мыши с физиологической беременностью; 2-я (гепатоз)

Genetics (Novosibirsk). The animals were placed in plastic cages, 5 individuals per cage (one male and four females), and kept in standard conditions with free access to food and water. Pregnancy in females was recorded when a copulatory plug was seen in the vagina.

Acute hepatitis was induced on the 13th day of pregnancy by a single intraperitoneal injection of a 50% carbon tetrachloride solution in olive oil at a dose of 0.3 ml/kg.

Correction of acute hepatitis was performed from the 14–15th day of pregnancy (the day following the carbon tetrachloride administration) for 5 days, by a single intraperitoneal injection of the IH preparation at a dose of 1 U per mouse (5 U in total). IH, modified with activated polyethylene oxide with a molecular weight of 1500 Da using electron-beam synthesis (the technology was developed by Scientific Future Management LLC (Novosibirsk) and the Research Institute of Pharmacology (Tomsk)) was administered. The choice of IH as a preparation for correction based on its pharmacological effects, consisting in significant stimulation of proliferation and differentiation of both regional liver stem cells and bone marrow progenitor cells [17]. It was shown that the administration of IH to rats with  $\text{CCl}_4$ -induced hepatitis had anti-inflammatory, anti-sclerotic and anti-cholestatic effects [18, 19].

The mice were divided into four groups: group 1 (control) included 25 intact pregnant mice; group 2 (hepatosis) included 25 mice with acute toxic hepatitis induced by carbon tetrachloride on the 13th day of pregnancy; group 3 (hepatosis + IH) included 25 pregnant mice with acute toxic hepatitis induced on the 13th day and its correction with IH on the 14th day of pregnancy; group 4 (IH) – 25 intact pregnant mice that received IH on the 14th day of pregnancy. In all groups, sampling was carried out on the 18th and 21st days of pregnancy and on the 1st, 10th and 15th days after birth.

The study was carried out in accordance with the principles of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes (ETS 123, Strasbourg, 1986) and the Directive of the European Parliament and of the Council (2010/63/EU, Strasbourg, 2010). Animals were removed from the experiment by cervical dislocation under ether anesthesia.

Liver and uterus samples were fixed in 10% neutral formalin, histological processing was performed, and the samples were embedded in paraffin. A 5 µm sections were stained with hematoxylin and eosin.

Immunohistochemical reaction was performed with antibodies to estrogen (clone SP1, rabbit mono-

группа (25 животных) включала мышей с индуцированием тетрахлорметаном острого токсического гепатоза на 13-е сутки беременности; 3-я (гепатоз + ИГ) группа (25 животных) – беременность мышей с индуцированием острого токсического гепатоза на 13-е сутки и его коррекцией ИГ на 14-е сутки беременности; 4-я группа (ИГ) (25 животных) – мыши с физиологической беременностью и введением на 14-е сутки беременности ИГ. Во всех группах забор материала проводили на 18 и 21-й день беременности и на 1, 10 и 15-й день после родов.

Исследование проводилось в соответствии с принципами Европейской конвенции о защите позвоночных животных (ETS 123, Страсбург, 1986) и Директивы Европарламента и Совета ЕС (2010/63/EU, Страсбург, 2010). Животных выводили из эксперимента путем дислокации шейных позвонков под эфирным наркозом.

Образцы печени и матки фиксировали в 10% нейтральном формалине, проводили гистологическую проводку, материал заливали в парафин. Приготовленные микропрепараты толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином.

Иммуногистохимическую реакцию проводили с антителами к эстрогеновым (клон SP1, rabbit monoclonal antibody, Thermo Scientific) и прогестероновым (клон PGR 636, mouse monoclonal antibody, Dako) рецепторам на аппарате Autostainer Link 48. Для оценки использовали полимерную детекционную систему с пероксидазной меткой (EnVision FLEX, Dako), проводили доокрашивание ядер клеток гематоксилином. Полученные микропрепараты исследовали с использованием светового микроскопа Eclipse E200 (Nikon, Япония), изображения получали с помощью цифровой камеры M1400 Plus (Levenhuk, Китай).

Подсчитывали численную плотность (Nai) в тестовой площади положительно окрашенных рецепторных ядер в миоцитах в 100 полях зрения для каждого периода наблюдения, независимо от интенсивности окрашивания, индекс соотношения эстрогенов к прогестерону.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием лицензионного пакета программ прикладной статистики Microsoft Excel 365, определяли среднюю величину (M) и стандартную ошибку среднего (m). Характеристики выборок представлены как  $M \pm m$ . Статистическая значимость различий средних значений была определена с использованием *t*-критерия Стьюдента для независимых выборок при  $p < 0.05$ .

clonal antibody, Thermo Scientific) and progesterone receptors (clone PGR 636, mouse monoclonal antibody, Dako) using an Autostainer Link 48. For evaluation, an EnVision FLEX (Dako) visualization system with a peroxidase mark was used, and cell nuclei were additionally stained with hematoxylin. The slides obtained were examined using an Eclipse E200 light microscope (Nikon, Japan), and images were made using an M1400 Plus digital camera (Levenhuk, China).

The numerical density (Nai) of positively stained receptor nuclei in the test area of myocytes in 100 visual fields was calculated for each time point, regardless of intensity of staining, and the estrogen/progesterone expression index.

Statistical processing of the data was performed using a licensed Microsoft Excel 365 statistic programs, the mean value (M) and standard error of the mean (m) were determined. Sample characteristics are presented as  $M \pm m$ . Statistical significance of differences for mean values was determined using Student's *t*-test for independent samples at  $p < 0.05$ .

## RESULTS

The microscopic examination of the liver of mice in group 2 (hepatosis) revealed small, medium and large vacuolar degeneration of hepatocytes, sites of hepatocyte necrosis from focal to massive, binuclear hepatocytes, and vascular congestion (Fig. 1).

When comparing the expression levels of estrogen and progesterone receptors on the 18th and 21st days of pregnancy between groups 1 (intact) and 2 (toxic hepatosis), no differences were revealed: the expression of sex hormones remained at the same level on the 18th and 21st days of pregnancy in both groups (Table 1, Fig. 2). In mice of group 4 (IH), significant differences were found both on the 18th and 21st days of pregnancy for both hormone-receptor complexes compared to animals of group 2 (toxic hepatosis): on the 18th day of pregnancy, the number of estrogen receptors in mice of group 2 (toxic hepatosis) was 1.5 times less compared to the same indicator in mice of group 4 (IH), and progesterone receptors were 1.4 times less. On the 21st day of pregnancy, the number of estrogen receptors in mice of the 4th (IH) group was 3.4 times lower, and progesterone receptors were 3.9 times lower compared with the same indicator in mice of the 2nd (hepatosis) group.

On the 18th day of pregnancy, the number of myocytes with positive expression of progesterone was lower in mice of group 4 (IH) compared to the same indicator in mice of the 2nd (hepatosis) and 3rd (hepatosis + IH) groups by 1.5 times. On the 21st day of pregnancy, the number of myocytes with posi-

## РЕЗУЛЬТАТЫ

При микроскопическом исследовании печени мышей 2-й (гепатоз) группы обнаруживаются мелко-, средне- и крупновакуольная дистрофия гепатоцитов, фокусы некроза гепатоцитов от очаговых до массивных, двуядерные гепатоциты, полнокровие сосудов (рис. 1).

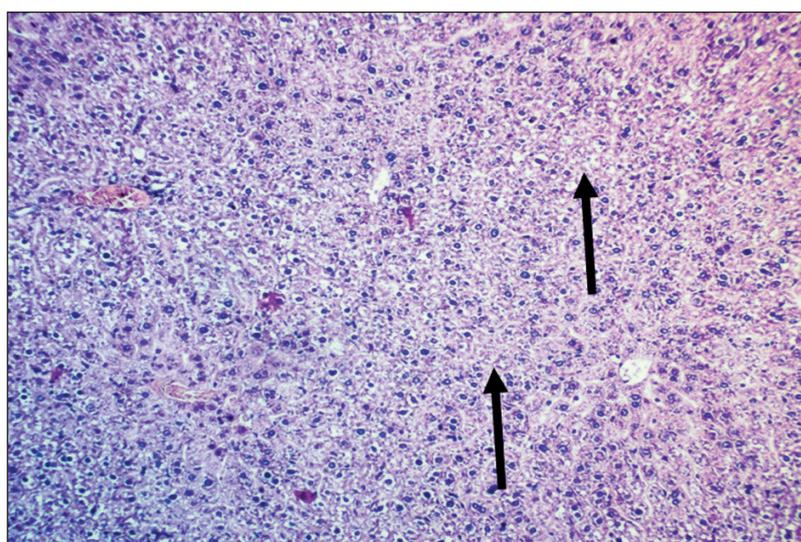
При сравнении показателей экспрессии рецепторов эстрогена и прогестерона на 18 и 21-е сутки беременности между 1-й (интактной) и 2-й (токсический гепатоз) группами было выявлено, что различия в показателях отсутствуют: экспрессия половых гормонов сохраняется на 18 и 21-е сутки беременности на одинаковом уровне в обеих группах (табл. 1, рис. 2). У мышей 4-й группы (ИГ) наблюдались достоверные различия как на 18-е, так и на 21-е сутки беременности для обоих рецепторных аппаратов по сравнению с животными 2-й (токсический гепатоз) группы: на 18-е сутки беременности количество рецепторов эстрогена у мышей во 2-й (токсический гепатоз) группе было в 1.5 раза больше по сравнению с аналогичным показателем у мышей 4-й (ИГ) группы, рецепторов прогестерона – больше в 1.4 раза; на 21-е сутки беременности количество рецепторов к эстрогену у мышей 4-й (ИГ) группы было меньшим в 3.4 раза, а рецепторов прогестерона – в 3.9 раза, в сравнении с аналогичным показателем у мышей 2-й (гепатоз) группы.

На 18-е сутки беременности количество миоцитов с положительной экспрессией прогестерона

was also decreased compared to the same indicator in mice of the 1st (intact), 2nd (hepatosis) and 3rd (hepatosis + IH) groups by 4.0, 4.2 and 3.5 times, respectively (Table 1, Fig. 3).

An analysis of the estrogen/progesterone expression index in myocytes have demonstrated its increase during pregnancy from the 18th to the 21st day in all groups except the 1st (intact) group, and more significantly in the 3rd (hepatosis + IH) and 4th (IH) groups, which is due to the predominance of the estrogen expression in myocytes, with insignificant changes in the expression of progesterone during pregnancy.

In the postpartum period, the results of the morphometric study of the expression of sex hormones in myocytes showed that in mice of the 2nd (hepatosis) group, compared with animals of the 1st (intact) group, there is a sharp increase in the number of expressing estrogen receptors in dynamics: on the 1st day after birth, the number of estrogen receptors was 5.5 times higher; by the 10th day – 2.8 times higher; by the 15th day after birth – 1.7 times higher (Table 2). In mice of the 3rd group (hepatosis + IH), the numerical density of myocytes with positive estrogen expression was lower in comparison with the same indicator in mice of the 2nd (hepatosis) group on the 1st day of the postpartum period by 1.7 times, on the 10th day – by 1.9 times, on the 15th day – by 4%; compared with the same indicator in mice of the 1st (intact) group on the 1st day of the



**Рис. 1.** Печень самки мыши линии C57Bl/6 с острым  $\text{CCl}_4$ -индуцированным гепатозом на 1-е сутки после родов: гепатоциты в состоянии гидропической дистрофии, крупные очаги некроза (показано стрелками).

Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 100$

**Fig. 1.** The liver of a female C57Bl/6 mouse with acute  $\text{CCl}_4$ -induced hepatosis on the 1st day after birth: hydropic degeneration of hepatocytes, large foci of necrosis (shown by the arrows).

Stained with hematoxylin and eosin. Magnification  $\times 100$

**Таблица 1.** Сравнение экспрессии рецепторов эстрогена и прогестерона в миоцитах во время беременности у мышей линии C57Bl/6 при CCl<sub>4</sub>-индуцированном гепатозе и его коррекции иммобилизированной гиалуронидазой (ИГ) (M ± m)

**Table 1.** Comparison of the estrogen and progesterone receptor expression in myocytes during pregnancy in C57Bl/6 mice with CCl<sub>4</sub>-induced hepatosis and its correction with immobilized hyaluronidase (IH) (M ± m)

| Показатели экспрессии<br>Expression indicators   | Животные 1-й (интактной) группы<br>Animals of the 1st (intact) group |                        | Животные 2-й группы (гепатоз)<br>Animals of the 2nd group (hepatosis) |                        | Животные 3-й группы (гепатоз + ИГ)<br>Animals of the 3rd group (hepatosis + IH) |                         | Животные 4-й группы (ИГ)<br>Animals of the 4th group (IH) |                                |
|--|--|------------------------|---|------------------------|---|-------------------------|---|--------------------------------|
|  | 18-е сутки<br>18th day   | 21-е сутки<br>21st day | 18-е сутки<br>18th day  | 21-е сутки<br>21st day | 18-е сутки<br>18th day  | 21-е сутки<br>21st day  | 18-е сутки<br>18th day                                    | 21-е сутки<br>21st day         |
| Рецепторы к эстрогену<br>Estrogen receptors  | 1.5 ± 0.2  | 5.78 ± 0.46            | 1.49 ± 0.22   | 6.76 ± 0.37            | 1.21 ± 0.1  | 6.22 ± 0.28             | 0.97 ± 0.13 <sup>b</sup>                                  | 1.96 ± 0.67 <sup>b, c</sup>    |
| Рецепторы к прогестерону<br>Progesterone receptors   | 1.02 ± 0.22  | 4.15 ± 0.34            | 1.18 ± 0.13   | 4.29 ± 0.26            | 1.25 ± 0.1  | 3.5 ± 0.24 <sup>b</sup> | 0.81 ± 0.08 <sup>b, c</sup>                               | 1.01 ± 0.09 <sup>a, b, c</sup> |
| Индекс соотношения рецепторов половых гормонов<br>The estrogen/progesterone expression index | 1.47   | 1.4                    | 1.26  | 1.6                    | 0.97  | 1.7                     | 1.2   | 2.92                           |

<sup>a</sup> Достоверные различия средних величин в сравнении с мышами 1-й (интактной) группы того же периода наблюдения (при  $p < 0.05$ ). Significant differences in mean values compared to mice of the 1st (intact) group of the same time point (at  $p < 0.05$ ).

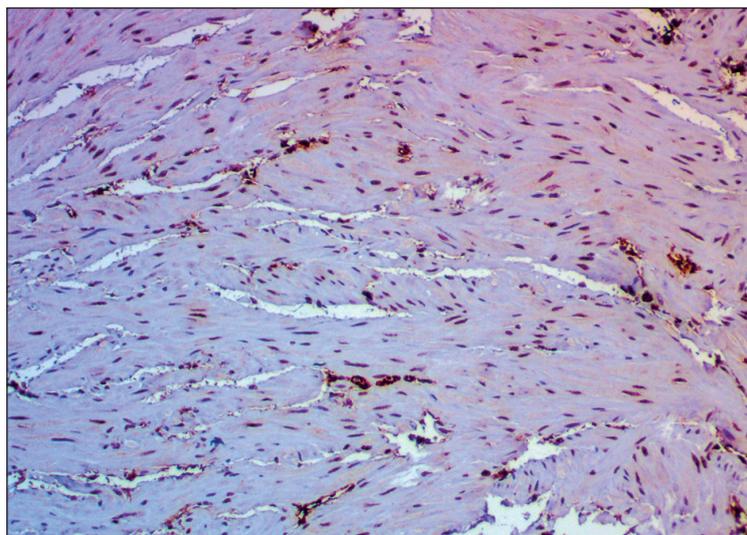
<sup>b</sup> Достоверные различия в сравнении с мышами 2-й (гепатоз) группы того же периода наблюдения (при  $p < 0.05$ ). Significant differences compared to mice of the 2nd (hepatosis) group of the same time point (at  $p < 0.05$ ).

<sup>c</sup> Достоверные различия в сравнении с мышами 3-й (гепатоз + ИГ) группы того же периода наблюдения (при  $p < 0.05$ ). Significant differences compared to mice of the 3rd group (hepatosis + IH) of the same time point (at  $p < 0.05$ ).

было меньшим у мышей 4-й (ИГ) группы в сравнении с аналогичным показателем у мышей 2-й (гепатоз) и 3-й (гепатоз + ИГ) групп в 1.5 раза; на 21-е сутки беременности количество миоцитов с положительной экспрессией прогестерона у мышей 4-й

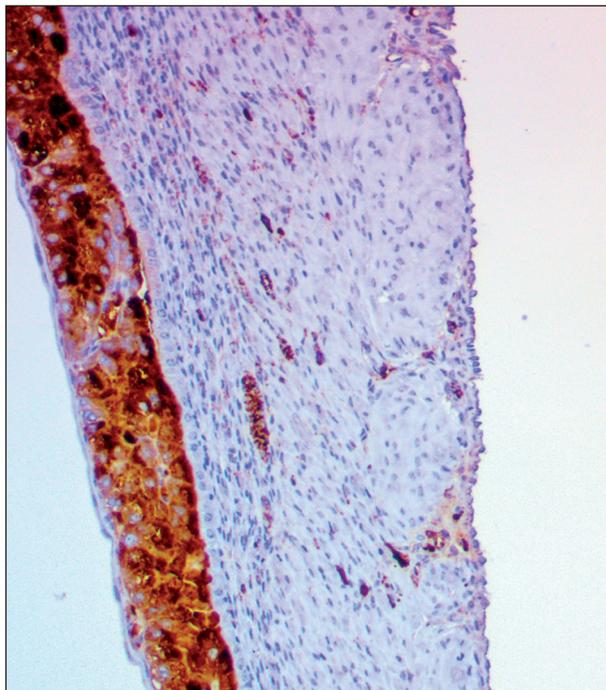
postpartum period – 3 times, on the 10th day – 1.5 times, but remained higher on the 15th day by 1.7 times (Table 2).

The expression of progesterone receptors in myocytes of mice of group 2 (hepatosis) has minor



**Рис. 2.** Миометрий мыши линии C57Bl/6 с острым CCl<sub>4</sub>-индуцированным гепатозом, 21-е сутки беременности: выраженная экспрессия ядерных рецепторов к эстрогену в миоцитах. Докраска гематоксилином. Увеличение ×400

**Fig. 2.** The myometrium of a C57Bl/6 mouse with acute CCl<sub>4</sub>-induced hepatosis, 21st day of pregnancy: significant expression of nuclear estrogen receptors in myocytes. Counterstained with hematoxylin. Magnification ×400



**Рис. 3.** Матка мыши линии С57В1/6 с острым  $\text{CCl}_4$ -индуцированным гепатозом, 18-е сутки беременности. Наблюдается выраженная экспрессия ядерных рецепторов к прогестерону в миоцитах и эпителиоцитах эндометрия (слева). Докраска гематоксилином. Увеличение  $\times 100$

**Fig. 3.** The uterus of a С57В1/6 mouse with acute  $\text{CCl}_4$ -induced hepatosis, the 18th day of pregnancy. Significant expression of nuclear receptors to progesterone in myocytes and endometrial epithelial cells (left). Counterstained with hematoxylin. Magnification  $\times 100$

группы было также уменьшенным в сравнении с аналогичным показателем у мышей 1-й (интактной), 2-й (гепатоз) и 3-й (гепатоз + ИГ) групп в 4.0, 4.2 и 3.5 раза соответственно (табл. 1, рис. 3).

Анализ индекса соотношения экспрессии в миоцитах эстрогена к прогестерону продемонстрировал в период беременности, что индекс возрастает с 18-х к 21-м суткам беременности во всех группах, кроме 1-й (интактной) группы, более выражено в 3-й (гепатоз + ИГ) и 4-й (ИГ) группах, что обусловлено преобладанием экспрессии в миоцитах эстрогена, при незначительных изменениях экспрессии прогестерона в период беременности.

В послеродовой период результаты морфометрического исследования экспрессии половых гормонов в миоцитах показали, что у мышей 2-й (гепатоз) группы в сравнении с животными 1-й (интактной) группы в динамике происходит резкое увеличение количества экспрессирующих эстрогеновых рецепторов: в 1-е сутки после родов количество рецепторов к эстрогену становится в 5.5 раза большим; к 10-м суткам – в 2.8 раза большим; к 15-м суткам после родов – в 1.7 раза больше (табл. 2). У мышей 3-й (гепатоз + ИГ) группы численная плотность миоцитов с поло-

differences from that in animals of group 1 (intact), which proves that the main disorders of the postpartum involution of the mice myometrium are associated with liver pathology, namely, with reduced inactivation of estrogen receptors. In mice of group 3 (hepatosis + IH), the number of myocytes expressing progesterone on the 1st day of the postpartum period was 1.2 times lower than the same indicator in mice of group 2 (hepatosis). In mice of group 4, the number of myocytes expressing progesterone was lower compared to the same indicator in mice of groups 1 (intact), 2 (hepatosis), 3 (hepatosis + IH) on the 10th and 15th days of the postpartum period (Table 2).

When assessing the estrogen/progesterone expression index in myocytes, it is clearly seen that the index increases by the 15th day of the postpartum period in all groups, more pronounced being in the 1st (intact), 2nd (hepatosis) and 4th (IH) groups, which is due to the estrogen expression predominance in myocytes.

## DISCUSSION

Previously, it was shown that the myometrial postpartum involution in mice with acute  $\text{CCl}_4$ -induced hepatosis was not completed by the 10th day of the postpartum period, and the leading mecha-

**Таблица 2.** Результаты морфометрического исследования экспрессии рецепторов эстрогена и прогестерона в миоцитах у мышей линии C57Bl/6 в послеродовый период при  $CCl_4$ -индуцированном гепатозе и его коррекции иммобилизированной гиалуронидазой (ИГ) ( $M \pm m$ )  
**Table 2.** Results of the morphometric study of the expression of estrogen and progesterone receptors in myocytes in C57Bl/6 mice in the postpartum period in  $CCl_4$ -induced hepatitis and its correction with immobilized hyaluronidase (IH) ( $M \pm m$ )

| Показатели экспрессии<br>Expression indicators   | Животные 1-й (интактной) группы<br>Animals of the 1st (intact) group |                        | Животные 2-й группы (гепатоз)<br>Animals of the 2nd group (hepatosis) |                          | Животные 3-й группы (гепатоз + ИГ)<br>Animals of the 3rd group (hepatosis + IH) |                          | Животные 4-й группы (ИГ)<br>Animals of the 4th group (IH) |                          |                           |                        |                           |                              |
|--|--|------------------------|---|--------------------------|---|--------------------------|---|--------------------------|---------------------------|------------------------|---------------------------|------------------------------|
|  | 10-е сутки<br>10th day   | 15-е сутки<br>15th day | 1-е сутки<br>1st day  | 10-е сутки<br>10th day   | 15-е сутки<br>15th day  | 1-е сутки<br>1st day     | 10-е сутки<br>10th day                                    | 15-е сутки<br>15th day   | 1-е сутки<br>1st day      | 10-е сутки<br>10th day | 15-е сутки<br>15th day    |                              |
| Рецепторы к эстрогену<br>Estrogen receptors  | 0.18 ± 0.04  | 288 ± 0.18             | 4.21 ± 0.36   | 0.99 ± 0.12 <sup>a</sup> | 8.07 ± 0.28 <sup>a</sup>  | 7.42 ± 0.59 <sup>a</sup> | 0.57 ± 0.05 <sup>ab</sup>                                 | 4.21 ± 0.12 <sup>b</sup> | 7.14 ± 0.47 <sup>ab</sup> | 0.14 ± 0.02            | -                         | 1.61 ± 0.17 <sup>a,b,c</sup> |
| Рецепторы к прогестерону<br>Progesterone receptors   | 3.77 ± 0.18  | 8.01 ± 0.29            | 407 ± 0.3   | 477 ± 0.17 <sup>a</sup>  | 7.84 ± 0.28 <sup>a</sup>  | 4.38 ± 0.67              | 3.99 ± 0.17 <sup>b</sup>                                  | 7.89 ± 0.1 <sup>b</sup>  | 4.74 ± 0.34               | 3.32 ± 0.16            | 5.83 ± 0.3 <sup>a,c</sup> | 1.26 ± 0.1 <sup>a,b,c</sup>  |
| Индекс соотношения рецепторов половых гормонов<br>The estrogen/progesterone expression index | 0.05   | 0.36                   | 1.0   | 0.2                      | 1.02  | 1.7                      | 0.14  | 0.5                      | 1.5                       | 0.04                   | 0.36                      | 1.3                          |

<sup>a</sup> Достоверные различия средних величин в сравнении с мышами 1-й (интактной) группы того же периода наблюдения (при  $p < 0.05$ ).  
 Significant differences in mean values compared to mice of the 1st (intact) group of the same time points (at  $p < 0.05$ ).

<sup>b</sup> Достоверные различия в сравнении с мышами 2-й (гепатоз) группы того же периода наблюдения (при  $p < 0.05$ ).  
 Significant differences compared to mice of the 2nd (hepatosis) group of the same time points (at  $p < 0.05$ ).

<sup>c</sup> Достоверные различия в сравнении с мышами 3-й (гепатоз + ИГ) того же периода наблюдения (при  $p < 0.05$ ).  
 Significant differences compared to mice of the 3rd group (hepatosis + IH) of the same time points (at  $p < 0.05$ ).

жительной экспрессией эстрогенов была меньше в сравнении с аналогичным показателем у мышей 2-й (гепатоз) группы на 1-е сутки послеродового периода в 1.7 раза, на 10-е сутки – в 1.9 раза, на 15-е сутки – на 4 %; в сравнении с аналогичным показателем у мышей 1-й (интактной) группы на 1-е сутки послеродового периода – в 3 раза, на 10-е сутки – в 1.5 раза, но оставалось большим на 15-е сутки в 1.7 раза (см. табл. 2).

Экспрессия рецепторов прогестерона в миоцитах у мышей 2-й (гепатоз) группы имеет незначительные различия с животными 1-й (интактной) группы, что доказывает, что основные нарушения послеродовой инволюции миометрия мышей связаны с патологией печени, а именно – со сниженной инактивацией рецепторов эстрогена. У мышей 3-й (гепатоз + ИГ) группы количество миоцитов, экспрессирующих прогестерон, на 1-е сутки послеродового периода было меньшим в 1.2 раза в сравнении с аналогичным показателем у мышей 2-й (гепатоз) группы. У мышей 4-й группы количество миоцитов, экспрессирующих прогестерон, было меньшим в сравнении с аналогичным показателем у мышей 1-й (интактной), 2-й (гепатоз), 3-й (гепатоз + ИГ) групп на 10 и 15-е сутки послеродового периода (см. табл. 2).

При оценке индекса соотношения экспрессии в миоцитах эстрогена к прогестерону отчетливо видно, что индекс возрастает к 15-м суткам послеродового периода во всех группах, более выражено в 1-й (интактная), 2-й (гепатоз) и 4-й (ИГ) группах, что обусловлено преобладанием экспрессии в миоцитах эстрогена.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее было показано, что процессы послеродовой инволюции миометрия у мышей с острым  $\text{CCl}_4$ -индуцированным гепатозом не завершались к 10-м суткам послеродового периода, при этом ведущим механизмом послеродовой инволюции явились класмацитоз и апоптоз [20].

Повреждение печени, вероятно, приводит к нарушению инактивации половых стероидных гормонов и повышению их уровня в сыворотке крови, который, как известно, является главным физиологическим регулятором экспрессии рецепторов половых гормонов [21]. Учитывая полученные результаты, значительное повышение уровня экспрессии ядерных рецепторов к эстрогену может быть связано с гиперэстрогемией вследствие повреждения печени и нарушения ее функции и тем самым обуславливать замедление процессов инволюции миометрия [22]. Кроме того, показано увеличение диаметра

of postpartum involution was clasmacytosis and apoptosis [20].

Liver damage probably leads to the impairment of sex steroid hormone inactivation and an increase in their serum levels which are known to be the main physiological regulator of sex hormone receptor expression [21]. Taking into account the results obtained, a significant increase in the expression level of nuclear estrogen receptors may be associated with hyperestrogenism due to liver damage and its dysfunction, and thereby cause a slowdown of myometrial involution [22]. In addition, an increase in the diameter of myometrium vessels in mice with acute  $\text{CCl}_4$ -induced hepatosis has been shown compared to animals with physiologically developing pregnancy [23], which may also probably be a consequence of hyperestrogenism since estrogens have a vasodilatory effect [23, 24].

In turn, progesterone cannot enhance the formation of its own receptors, moreover, a high level of progesterone can suppress their synthesis, as well as the synthesis of estrogen receptors alpha, and, simultaneously, increase the expression of estrogen receptors beta [4]. The results obtained demonstrate that the expression of nuclear progesterone receptors was higher in mice of the 2nd (hepatosis) group compared to mice of the 1st (intact) group on the 1st day, but on the 10th and 15th days the indicator remained stable. Thus, it can be assumed that from the 10th to 15th day, upon reaching a certain level of serum progesterone, the effect of inhibition of its own receptors was realized.

In acute  $\text{CCl}_4$ -induced hepatosis, the index of nuclear expression of estrogen and progesterone receptors in uterine myocytes changes: the most pronounced expression of estrogen and progesterone receptors was on the 10th and 15th days after birth and led to an impaired postpartum uterine involution [20]. The impairment of sex hormone metabolism in mice with acute  $\text{CCl}_4$ -induced hepatosis in the form of hyperestrogenism accompanies the predominance of such processes as clasmacytosis and apoptosis in the mechanisms of postpartum involution.

In the correction of acute toxic hepatosis with IH, regeneration processes in the liver parenchyma are significantly enhanced. In the model of chronic hepatitis, it was shown that the administration of IH 3 times at a dose of 50 U/kg every other day led to a strong stimulation of the cell renewal systems involved in the regeneration of the damaged liver. The implementation of these mechanisms was apparently manifested in the activation of proliferative processes of early bone marrow precursors, their mobilization into peripheral blood flow and homing to liver tissue with subsequent formation of tissue-specific parenchyma-

сосудов миометрия мышей, перенесших острый  $\text{CCl}_4$ -индуцированный гепатоз, по сравнению с животными с физиологически развивающейся беременностью [23], что также, вероятно, может являться следствием гиперэстрогемии, поскольку эстрогены обладают сосудорасширяющим действием [23, 24].

В свою очередь, прогестерон не может усиливать образование собственных рецепторов, более того, высокий уровень прогестерона может подавлять синтез собственных рецепторов, а также синтез рецепторов эстрогенов альфа и одновременно увеличивать экспрессию эстрогенов бета [4]. Полученные результаты демонстрируют, что экспрессия ядерных рецепторов к прогестерону была большей у мышей 2-й (гепатоз) группы в отличие от мышей 1-й (интактной) группы на 1-е сутки, но на 10 и 15-е сутки показатель сохранялся стабильным. Таким образом, можно предположить, что от 10-х к 15-м суткам при достижении определенного уровня прогестерона в сыворотке крови реализовался эффект подавления собственных рецепторов.

При остром  $\text{CCl}_4$ -индуцированном гепатозе изменяется индекс соотношения ядерной экспрессии рецепторов эстрогенов и прогестерона в миоцитах матки: наиболее выраженная экспрессия к исследованным рецепторам была отмечена на 10 и 15-е сутки после родов и приводило к нарушению послеродовой инволюции матки [20]. Нарушение метаболизма половых гормонов у мышей с острым  $\text{CCl}_4$ -индуцированным гепатозом в сторону гиперэстрогемии сопровождается преобладанием в механизмах послеродовой инволюции таких процессов, как клазмацитоз и апоптоз.

В условиях коррекции острого токсического гепатоза ИГ процессы регенерации в паренхиме печени значительно усиливаются. На модели хронического гепатита показано, что введение ИГ 3 раза по 50 ЕД/кг через день приводило к резкой стимуляции систем клеточного обновления, участвующих в восстановлении поврежденной печени. Реализация данных механизмов проявлялась, по-видимому, в активации пролиферативных процессов ранних предшественников костного мозга, их мобилизации в периферическую кровь и в хоминге в ткани печени с дальнейшим образованием тканеспецифичных паренхиматозных клеточных типов [17, 19]. В этой связи регенераторные процессы в печени способствовали восстановлению баланса половых гормонов и процессов послеродовой инволюции миометрия у мышей 3-й (гепатоз + ИГ) группы.

tous cell types [17, 19]. In this regard, regenerative processes in the liver contributed to the restoration of the balance of sex hormones and of the processes of postpartum myometrial involution in mice of the 3rd (hepatosis + IH) group.

## CONCLUSION

The study results allows us to draw the following conclusions:

1. During pregnancy in acute  $\text{CCl}_4$ -induced hepatitis, the expression of progesterone and estrogen receptors in the myometrium does not change and corresponds to that in intact pregnant mice.

2. In animals with acute  $\text{CCl}_4$ -induced hepatitis in the late postpartum period (up to 15 days), an increased expression of estrogen receptors in the myometrium is observed in relatively stable expression of progesterone, which probably contributes to the extension of uterine involution.

3. When the correction of acute  $\text{CCl}_4$ -induced hepatitis IH, the levels of estrogen and progesterone receptors' expression in the postpartum period decrease and generally correspond to thereof in intact pregnant mice.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование позволяет сделать следующие выводы:

1. Во время беременности при остром  $\text{CCl}_4$ -индуцированном гепатозе экспрессия рецепторов прогестерона и эстрогена в миометрии не изменяется и соответствует таковой у мышей с физиологически развивающейся беременностью.

2. У животных с острым  $\text{CCl}_4$ -индуцированным гепатозом в поздний послеродовой период (до 15 сут) отмечается повышенная экспрессия рецепторов эстрогенов в миометрии при относительно стабильных показателях экспрессии прогестерона, что, вероятно, способствует удлинению процесса инволюции матки.

3. При коррекции острого  $\text{CCl}_4$ -индуцированного гепатоза ИГ уровни экспрессии рецепторов к эстрогену и прогестерону в послеродовой период снижаются и в целом соответствуют аналогичным показателям мышей с физиологически развивающейся беременностью.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шкурупий В.А. Миометрий при беременности и после родов: Механизмы клеточных преобразований. Новосибирск: Наука, 2012.
2. Долгих О.В., Агафонов Ю.В., Зашихин А.Л. Гладкая мышечная ткань матки в период раннего пуэрперия: механизмы инволюции // Экология человека. 2012;12:31-35.
3. Довжикова И.В., Луценко М.Т. Современные представления о роли прогестерона (обзор литературы) // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2016;60:94-104. DOI: 10.12737/20128.
4. Довжикова И.В., Луценко М.Т. Современные представления о роли эстрогенов во время беременности (обзор литературы) // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2016;61:120-127. DOI: 10.12737/21463.
5. Simoncini T., Mannella P., Fornari L. et al. In vitro effects of progesterone and progestins on vascular cells // *Steroids*. 2003;68(10-13):831-836.
6. Birkness-Gartman J.E., Oshima K. Liver pathology in pregnancy // *Pathol. Int.* 2022;72(1):1-13.
7. Varlas V.N., Bohiltea R., Gheorghe G. et al. State of the art in hepatic dysfunction in pregnancy // *Healthcare (Basel)*. 2021;9(11):1481.
8. Надеев А.П., Жукова В.А., Травин М.А., Мозолева С.П. Патология печени и материнская смертность // *Архив патологии*. 2018;80(2):43-47. DOI: 10.17116/patol201880243-47.
9. Довжикова И.В., Андриевская И.А., Петрова К.К. Рецепторы прогестерона: репродуктивная роль // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2018;70:104-112. DOI: 10.12737/article\_5c1278d242a333.68376622.
10. Довжикова И.В., Андриевская И.А. Рецепторы эстрогенов (обзор литературы). Часть 1 // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2019;72:120-127. DOI: 10.36604/1998-5029-2019-73-125-133.
11. Csabai T., Pallinger E., Kovacs Á.F. Altered immune response and implantation failure in progesterone-induced blocking factor-deficient mice // *Front. Immunol.* 2020;11(349):1-9.
12. Репина М.А. Прогестерон и беременность // *Журнал акушерства и женских болезней*. 2011;60(3):130-135.
13. Тришина В.Л. Влияние прогестерона и гестагенов на развитие беременности // *Репродуктивное здоровье. Восточная Европа*. 2013;6(30):64-71.
14. Stjernholm Y.V., Nyberg A., Cardell M., Höybye C. Circulating maternal cortisol levels during vaginal delivery and elective cesarean section // *Arch. Gynecol. Obstet.* 2016;294(2):267-271. DOI: 10.1007/s00404-015-3981-x.
15. Terrault N.A., Williamson C. Pregnancy-associated liver diseases // *Gastroenterology*. 2022;163(1):97-117.e1.
16. Tsuchiya Y., Nakajima M., Yokoi T. Cytochrome P450-mediated metabolism of estrogens and its regulation in human // *Cancer Lett.* 2005;227(2):115-124.
17. Дыгай А.М., Зюзьков Г.Н., Жданов В.В. и др. Гепатопротекторные эффекты иммобилизованной с помощью нанотехнологии электронно-лучевого

## REFERENCES

1. Shkurupij V.A. (2012). *The myometrium during Pregnancy and after Birth: Mechanisms of Cellular Transformations*. Novosibirsk: Nauka. (In Russ.)
2. Dolgikh O.V., Agafonov Yu.V., Zashikhin A.L. The uterus smooth muscular tissue in early puerperium: involution mechanisms. *Human Ecology*. 2012;12:31-35. (In Russ.)
3. Dovzhikova I.V., Lutsenko M.T. Modern concepts of progesterone role (review). *Bulletin Physiology and Pathology of Respiration*. 2016;60:94-104. DOI: 10.12737/20128.
4. Dovzhikova I.V., Lutsenko M.T. Modern concepts of estrogens role at pregnancy (review). *Bulletin Physiology and Pathology of Respiration*. 2016;61:120-127. DOI: 10.12737/21463. (In Russ.)
5. Simoncini T., Mannella P., Fornari L. et al. In vitro effects of progesterone and progestins on vascular cells. *Steroids*. 2003;68(10-13):831-836.
6. Birkness-Gartman J.E., Oshima K. Liver pathology in pregnancy. *Pathol. Int.* 2022;72(1):1-13.
7. Varlas V.N., Bohiltea R., Gheorghe G. et al. State of the art in hepatic dysfunction in pregnancy. *Healthcare (Basel)*. 2021;9(11):1481.
8. Nadeev A.P., Zhukova V.A., Travin M.A., Mozoleva S.P. Liver disease and maternal mortality. *Akchiv Patologii*. 2018;80(2):43-47. DOI: 10.17116/patol201880243-47. (In Russ.)
9. Dovzhikova I.V., Andrievskaya I.A., Petrova K.K. Progesterone receptors: a reproductive role. *Bulletin Physiology and Pathology of Respiration*. 2018;70:104-112. DOI: 10.12737/article\_5c1278d242a333.68376622. (In Russ.)
10. Dovzhikova I.V., Andrievskaya I.A. Estrogen receptors (review). Part 1. *Bulletin Physiology and Pathology of Respiration*. 2019;72:120-127. DOI: 10.36604/1998-5029-2019-73-125-133. (In Russ.)
11. Csabai T., Pallinger E., Kovacs A.F. Altered immune response and implantation failure in progesterone-induced blocking factor-deficient mice. *Front. Immunol.* 2020;11(349):1-9.
12. Repina M.A. Progesterone and pregnancy. *Journal of Obstetrics and Women's Diseases*. 2011;60(3):130-135. (In Russ.)
13. Trishina V.L. The effect of progesterone and progestogens on the pregnancy development. *Reproductive Health. Eastern Europe*. 2013;6(30):64-71. (In Russ.)
14. Stjernholm Y.V., Nyberg A., Cardell M., Höybye C. Circulating maternal cortisol levels during vaginal delivery and elective cesarean section. *Arch. Gynecol. Obstet.* 2016;294(2):267-271. DOI: 10.1007/s00404-015-3981-x.
15. Terrault N.A., Williamson C. Pregnancy-associated liver diseases. *Gastroenterology*. 2022;163(1):97-117.e1.
16. Tsuchiya Y., Nakajima M., Yokoi T. Cytochrome P450-mediated metabolism of estrogens and its regulation in human. *Cancer Lett.* 2005;227(2):115-124.
17. Dygaj A.M., Zyuzkov G.N., Zhdanov V.V. et al. Mechanisms for hepatoprotective effects of hyaluronidase immobilized by the nanotechnology method of electron-beam synthesis. *Bulletin of Experimental Bio-*

- синтеза гиалуронидазы и механизмы их развития // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2011;151(1):86-90.
18. Дыгай А.М., Жданов В.В., Зюзьков Г.Н. и др. Гепатопротекторные эффекты иммобилизованных препаратов гранулоцитарного колониестимулирующего фактора и гиалуронидазы и механизмы их развития // Клеточные технологии в биологической медицине. 2012;1:14-18.
  19. Дыгай А.М., Зюзьков Г.Н., Гурто Р.В. и др. Влияние пегилированной гиалуронат-эндо- $\beta$ -N-ацетилгексозаминидазы на гуморальные механизмы регуляции функций прогениторных клеток при хроническом гепатите // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2013;155(2):140-143.
  20. Надеев А.П., Мадонов П.Г., Поротникова Е.В. и др. Послеродовая инволюция миометрия мышей при остром CCL<sub>4</sub>-индуцированном гепатозе и его коррекции иммобилизованной гиалуронидазой // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2022;173(2):246-251. DOI: 10.47056/0365-9615-2022-173-2-246-251.
  21. Xu L., Yuan Y., Che Z. et al. The hepatoprotective and hepatotoxic roles of sex and sex-related hormones // *Front. Immunol.* 2022;13:939631. DOI: 10.3389/fimmu.2022.939631.
  22. Wang Y., Abrahams V.M., Luo G. et al. Progesterone inhibits apoptosis in fetal membranes by altering expression of both pro- and antiapoptotic proteins // *Reprod. Sci.* 2018;25(8):1161-1167.
  23. Поротникова Е.В., Надеев А.П. Исследование васкуляризации миометрия у мышей в послеродовом периоде при остром CCL<sub>4</sub>-индуцированном гепатозе // *Уральский медицинский журнал.* 2019; 10(178):94-98. DOI: 10.25694/URMJ.2019.10.13.
  24. Nakagawa Y., Fujimoto J., Tamaya T. Placental growth by the estrogen-dependent angiogenic factors, vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor, throughout gestation // *Gynecol. Endocrinol.* 2004;19(5):259-266.
  25. Koshlich K.A., Zhdanov V.V., Zyuz'kov G.N. et al. Hepatoprotective effects of hyaluronidase preparation and their mechanisms. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2011;151(1):74-78. DOI: 10.1007/s10517-011-1263-6.
  18. Dygai A.M., Zhdanov V.V., Zyuz'kov G.N. et al. Hepatoprotective effects of granulocyte colony-stimulating factor and hyaluronidase preparation and their mechanisms. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2012;153:129-133. DOI: 10.1007/s10517-012-1660-5.
  19. Dygai A.M., Zyuz'kov G.N., Gurto R.V. et al. Effect of pegylated hyaluronate-endo- $\beta$ -N-acetylhexosaminidase on humoral mechanisms regulating the functions of progenitor cells during chronic hepatitis. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2013;155:179-182. DOI: 10.1007/s10517-013-2106-4.
  20. Nadeev A.P., Madonov P.G., Porotnikova E.V. et al. Postpartum involution of mouse myometrium in acute CCL<sub>4</sub>-induced hepatosis and its correction with immobilized hyaluronidase. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2022;173:265-269.
  21. Xu L., Yuan Y., Che Z. et al. The hepatoprotective and hepatotoxic roles of sex and sex-related hormones. *Front. Immunol.* 2022;13:939631. DOI: 10.3389/fimmu.2022.939631.
  22. Wang Y., Abrahams V.M., Luo G. et al. Progesterone inhibits apoptosis in fetal membranes by altering expression of both pro- and antiapoptotic proteins. *Reprod. Sci.* 2018;25(8):1161-1167.
  23. Porotnikova E.V., Nadeev A.P. Study of myometry vascularization in mice in the postpartum period under acute CCL<sub>4</sub>-induced hepatosis. *Ural Medical Journal.* 2019; 10(178):94-98. DOI: 10.25694/URMJ.2019.10.13. (In Russ.)
  24. Nakagawa Y., Fujimoto J., Tamaya T. Placental growth by the estrogen-dependent angiogenic factors, vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor, throughout gestation. *Gynecol. Endocrinol.* 2004;19(5):259-266.

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

**Коплич Ксения Александровна** – аспирант кафедры патологической анатомии ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия. ORCID: 0009-0007-8571-7375.

**Надеев Александр Петрович** – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой патологической анатомии ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0003-0400-1011.

**Мадонов Павел Геннадьевич** – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0002-1093-8938.

**Ершов Константин Игоревич** – канд. биол. наук, доцент кафедры фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины ФГБОУ ВО

## ABOUT THE AUTHORS

**Ksenia A. Koshlich** – Post-graduate Student, Department of Pathological Anatomy, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0009-0007-8571-7375.

**Alexander P. Nadeev** – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head, Department of Pathological Anatomy, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0003-0400-1011.

**Pavel G. Madonov** – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head, Department of Pharmacology, Clinical Pharmacology and Evidence-Based Medicine, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0002-1093-8938.

**Konstantin I. Ershov** – Cand. Sci. (Bio.), Associate Professor, Department of Pharmacology, Clinical Pharmacology and Evidence-Based Medicine, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0003-41399-0360.

**Tatyana A. Ageeva** – Dr. Sci. (Med.), Professor, Department of Pathological Anatomy, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0001-7933-8394.

«Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0003-41399-0360.

**Агеева Татьяна Августовна** – д-р мед. наук, профессор кафедры патологической анатомии ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0001-7933-8394.

**Чернова Татьяна Геннадьевна** – канд. мед. наук, доцент кафедры патологической анатомии ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0001-8468-0725.

**Бакуменко Злата Викторовна** – студентка 4-го курса ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия. ORCID: 0009-0007-5192-3648.

**Tatyana G. Chernova** – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Department of Pathological Anatomy, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0001-8468-0725.

**Zlata V. Bakumenko** – 4th Year Student, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0009-0007-5192-3648.



## Антиапоптотическое действие триметокси-замещенных монокарбонильных аналогов куркумина в условиях экспериментальной болезни Альцгеймера

Д.И. Поздняков<sup>1, 2</sup>, А.А. Вихорь<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России, Пятигорск, Россия

<sup>2</sup>Пятигорский государственный научно-исследовательский институт курортологии – филиал ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр медицинской реабилитации и курортологии» Минздрава России, Пятигорск, Россия

### АННОТАЦИЯ

**В в е д е н и е .** Болезнь Альцгеймера (БА) – одно из самых распространенных дементных расстройств с угрожающими темпами распространения. Значимая медико-социально-экономическая составляющая данного заболевания делает необходимым разработку новых средств для его лечения. При этом действие данных веществ может быть сосредоточено на отдельных патофизиологических механизмах заболевания, например, апоптозе.

**Ц е л ь .** Изучить влияние новых монокарбонильных аналогов куркумина на изменение реакции апоптоза в головном мозге крыс в условиях экспериментальной БА.

**М а т е р и а л ы и м е т о д ы .** БА моделировали у крыс-самок Wistar путем введения агрегатов β-амилоида (1-42) в СА1 сегмент гиппокампа. Изучаемые соединения (1E, 4E)-1,5-бис (3,4,5-триметоксифенил) пента-1,4-диен-3-он (шифр AZBAX4) и (1E, 4E)-1,5-бис (2,4,6-триметоксифенил) пента-1,4-диен-3-он (шифр AZBAX6) в дозах 20 мг/кг (перорально) каждое соединение и препарат сравнения донепезил в дозе 50 мг/кг (перорально) вводили на протяжении 30 дней с момента моделирования патологии, после чего у животных производили забор биоматериала (гиппокамп и кора больших полушарий), в котором оценивали изменение концентрации биомаркеров апоптоза: цитохрома С, апоптоз-индуцирующего фактора, каспазы 3 и белка PUMA.

**Р е з у л ь т а т ы .** Курсовое введение веществ AZBAX4 и AZBAX6, так же как и препарата сравнения, способствовало достоверному уменьшению концентрации проапоптотических биомаркеров, как в гиппокампе, так и в коре больших полушарий. При этом у животных, получавших соединение AZBAX4, по сравнению с крысами, которым вводили AZBAX6 и донепезил, концентрация биомаркеров внутреннего пути апоптоза (апоптоз-индуцирующего фактора и цитохрома С) была достоверно ( $p < 0.05$ ) ниже.

**З а к л ю ч е н и е .** Проведенное исследование показало актуальность дальнейшего изучения (1E, 4E)-1,5-бис (3,4,5-триметоксифенил) пента-1,4-диен-3-она как антиапоптотического средства, предназначенного для терапии БА.

**Ключевые слова:** болезнь Альцгеймера, нейропротекция, апоптоз, куркуминоиды.

**Образец цитирования:** Поздняков Д.И., Вихорь А.А. Антиапоптотическое действие триметокси-замещенных монокарбонильных аналогов куркумина в условиях экспериментальной болезни Альцгеймера // Journal of Siberian Medical Sciences. 2024;8(3):77-90. DOI: 10.31549/2542-1174-2024-8-3-77-90

Поступила в редакцию 13.05.2024  
Прошла рецензирование 16.05.2024  
Принята к публикации 30.05.2024

Автор, ответственный за переписку  
Поздняков Дмитрий Игоревич: Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России. 357532, г. Пятигорск, просп. Калинина, 11.  
E-mail: pozdniackow.dmitry@yandex.ru

Received 13.05.2024  
Revised 16.05.2024  
Accepted 30.05.2024

Corresponding author  
Dmitry I. Pozdnyakov: Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute, Branch of the Volgograd State Medical University, 11, Kalinina prosp., Pyatigorsk, 357532, Russia.  
E-mail: pozdniackow.dmitry@yandex.ru

## Anti-apoptotic effects of trimethoxy-substituted monocarbonyl curcumin analogues in experimental Alzheimer's disease

D.I. Pozdnyakov<sup>1, 2</sup>, A.A. Vikhor<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute, Branch of the Volgograd State Medical University, Pyatigorsk, Russia

<sup>2</sup>Pyatigorsk State Research Institute of Balneology, Branch of the Federal Scientific and Clinical Center for Medical Rehabilitation and Balneology, Pyatigorsk, Russia

### ABSTRACT

**I n t r o d u c t i o n .** Alzheimer's disease (AD) is one of the most common dementia disorders with an alarming rate of spread. The significant medical, social and economic burden of this disease makes it necessary to develop new agents for its treatment. In this case, the action of these agents can be focused on specific pathophysiological mechanisms of the disease, for example, apoptosis.

**A i m .** To study the effect of new monocarbonyl curcumin analogues on the change in the apoptotic response in rat brain under experimental AD.

**M a t e r i a l s a n d m e t h o d s .** AD was simulated in female Wistar rats by injecting beta-amyloid aggregates (1-42) into the CA1 region of the hippocampus. The studied compounds (1E, 4E)-1,5-bis (3,4,5-trimethoxyphenyl) penta-1,4-dien-3-one (code named AZBAX4) and (1E, 4E)-1,5-bis (2,4,6-trimethoxyphenyl) penta-1,4-dien-3-one (code named AZBAX6) at doses of 20 mg/kg (orally) each compound and the reference drug, donepezil at a dose of 50 mg/kg (orally) were administered for 30 days from the start of pathology modeling. Thereafter, samples of the hippocampus and cerebral cortex were collected from the animals for assessment of the concentration of apoptosis-related biomarkers: cytochrome c, apoptosis-inducing factor, caspase-3 and PUMA protein.

**R e s u l t s .** The administration of AZBAX4 and AZBAX6 compounds, as well as of the reference drug, contributed to a significant decrease in the concentration of proapoptotic biomarkers both in the hippocampus and cerebral cortex. The concentration of biomarkers of the intrinsic pathway of apoptosis (apoptosis-inducing factor and cytochrome c) was significantly ( $p < 0.05$ ) lower in animals treated with AZBAX4 compared to rats treated with AZBAX6 and donepezil.

**C o n c l u s i o n .** The present study showed the relevance of further investigation of (1E, 4E)-1,5-bis (3,4,5-trimethoxyphenyl) penta-1,4-dien-3-one as an anti-apoptotic agent for therapy of AD.

**Keywords:** Alzheimer's disease, neuroprotection, apoptosis, curcuminoids.

**Citation example:** Pozdnyakov D.I., Vikhor A.A. Anti-apoptotic effects of trimethoxy-substituted monocarbonyl curcumin analogues in experimental Alzheimer's disease. *Journal of Siberian Medical Sciences*. 2024;8(3):77-90. DOI: 10.31549/2542-1174-2024-8-3-77-90

### ВВЕДЕНИЕ

Деменция – это комплексный прогрессирующий нейродегенеративный процесс, сопутствующий развитию ряда когнитивных и некогнитивных нарушений. Одним из самых распространенных типов терминальной деменции в мире на сегодняшний момент считается болезнь Альцгеймера (БА), которая является одной из основных проблем общественного здравоохранения во всем мире [1]. На данный момент насчитывается более 55 млн чел. с подтвержденным диагнозом БА, проживающих преимущественно в экономически развитых странах с высокой долей населения старческого возраста. К 2050 г. специалисты здравоохранения ВОЗ и Alzheimer's Disease

### INTRODUCTION

Dementia is a complex progressive neurodegenerative disorder that accompanies the development of a number of cognitive and non-cognitive impairments. Today, one of the most common forms of advanced dementia throughout the world is considered being Alzheimer's disease (AD), which is a major public health problem worldwide [1]. Currently, there are more than 55 million people with a confirmed diagnosis of AD, living mainly in developed countries with a high proportion of elderly population. By 2050, WHO and Alzheimer's Disease International experts are expecting that the number of patients with this pathology will increase to 139 million people [2]. Besides, the

International прогнозируют увеличение числа пациентов с данной патологией до 139 млн чел. [2]. Кроме высокого уровня заболеваемости за последние годы увеличилось число случаев летального исхода от БА, которая является пятой по распространенности причиной смертности. Такой показатель является характерным для «болезней тысячелетия», например, артериальной гипертензии, ишемической болезни сердца или ишемического инсульта [3].

Характерной чертой БА, определяющей столь высокие показатели заболеваемости, летальности, а также сложности выбора тактик лечения, является комплексный патогенез, включающий ряд взаимосвязанных процессов [4], среди которых выделяют нейровоспаление, возникающее из-за высвобождения ряда определенных цитокинов (например ФНО- $\alpha$ ), образование нейрофибрилярных агрегатов тау-белка, внеклеточное отложение  $\beta$ -амилоида ( $A\beta$ ), митохондриальную дисфункцию, окислительный стресс [5, 6]. В то же время одним из ведущих патофизиологических механизмов, приводящих к развитию нейродегенерации преимущественно в коре больших полушарий и гиппокампе, является апоптоз [7, 8]. Апоптоз характеризуется как морфологическими, так и биохимическими изменениями, происходящими внутри клетки под действием различных стимулов. В процессе апоптоза клетка начинает разрушаться «изнутри» за счет действия протеолитических ферментов – каспаз (в частности каспазы 3), отвечающих за реализацию апоптоза [9]. Однако, помимо непосредственного участия в апоптотическом процессе, каспазы способствуют образованию  $A\beta$  из мембранного белка-предшественника амилоида и формированию конгломератов тау-белка, реализуя тем самым многофакторное влияние на патогенез БА [10].

Активация апоптоза происходит двумя путями: внешним и внутренним. Внешний путь апоптоза активируется извне клетки и часто индуцируется рецепторами фактора некроза опухоли (TNFR), имеющими в структуре домен FADD, а также некоторыми транскрипционными факторами, например, p53-зависимым регулятором апоптоза (PUMA) [11]. Внутренний путь апоптоза является рецепторно-опосредованным и инициируется внутриклеточными стимулами, связанными прежде всего с митохондриями клетки. Так, накопление  $A\beta$  приводит к формированию митохондриальной поры переменной проницаемости, что сопровождается выходом из митохондрий проапоптотических молекул,

high morbidity rate, the number of deaths from AD, which is the fifth most common cause of death, has increased in recent years. Such a rate is characteristic of millennium diseases, such as arterial hypertension, coronary artery disease or ischemic stroke [3].

The peculiarity of AD, which determines such high rates of morbidity, mortality, as well as the complexity of the choice of a therapeutic tactics, is a multifacet pathogenesis, including several interrelated processes [4]: neuroinflammation due to the release of several specific cytokines (e.g., TNF- $\alpha$ ), formation of tau-protein neurofibrillary aggregates, extracellular amyloid-beta ( $A\beta$ ) deposition, mitochondrial dysfunction, and oxidative stress [5, 6]. At the same time, apoptosis is one of the basic pathophysiological mechanisms leading to the development of neurodegeneration mainly in the cerebral cortex and hippocampus [7, 8]. Apoptosis is characterized by both morphological and biochemical changes inside the cell under the influence of various stimuli. During apoptosis, the cell begins to disintegrate inside due to the action of proteolytic enzymes – caspases (in particular caspase-3), providing the realization of apoptosis [9]. However, in addition to direct participation in the apoptotic process, caspases promote the formation of  $A\beta$  from the cell membrane amyloid precursor protein and tau-protein aggregates, thereby influencing AD pathogenesis in a multifactorial manner [10].

Apoptosis activation occurs through two pathways: extrinsic and intrinsic. The extrinsic pathway of apoptosis is activated outside the cell and is often induced by tumor necrosis factor receptors (TNFR), which have FADD domain in their structure, as well as by some transcription factors, such as p53-upregulated modulator of apoptosis (PUMA) [11]. The intrinsic apoptotic pathway is non-receptor-mediated and is initiated by intracellular stimuli associated primarily with the cell's mitochondria. Thus,  $A\beta$  accumulation leads to the formation of a mitochondrial pore of variable permeability, which is accompanied by release of proapoptotic molecules, such as cytochrome c and apoptosis-inducing factor (AIF), from mitochondria [12].

Given the neuronal death by apoptotic mechanisms is an integral part of AD pathophysiology, this process can be corrected pharmacologically by realizing one of the new strategies of AD pathogenetic therapy – apoptosis targeting. At present, a number of promising compounds are being studied in this context: filgrastim, epigallocatechin gallate, curcumin, nicergoline, minocycline [13]. Previous studies have demonstrated that trimethoxy-substituted

например цитохрома С и апоптоз-индуцирующего фактора (АИФ) [12].

Учитывая, что гибель нейронов по механизмам апоптоза является неотъемлемой частью патофизиологии БА, данный процесс можно скорректировать фармакологически, реализуя одну из новых стратегий патогенетической терапии БА – целенаправленное воздействие на апоптоз. На данный момент в этом контексте изучается ряд перспективных соединений: филлагестим, эпигаллокатехин галлат, куркумин, ницерголин, миноциклин [13]. Ранее проведенные исследования продемонстрировали, что триметокси-замещенные монокарбонильные аналоги куркумина подавляют амилоидогенез и активность холинэстеразы *in vitro* и способствуют восстановлению митохондриальной функции *in vivo*, что делает их перспективными объектами для дальнейшего изучения в качестве средств патогенетической терапии БА [14]. Учитывая предполагаемый политаргетный характер действия данных соединений, целесообразным представляется изучение влияния монокарбонильных куркуминоидов на ход реакций апоптоза в условиях БА.

## ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение влияния новых монокарбонильных аналогов куркумина на изменение реакции апоптоза в головном мозге в условиях БА, вызванной введением фрагментов  $A\beta_{1-42}$  в гиппокамп лабораторных животных.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Экспериментальные животные.** Экспериментальную модель БА воспроизводили на 50 половозрелых крысах-самках линии Wistar, полученных из питомника лабораторных животных «Рапполово». Во время проведения исследования все животные содержались в помещениях лаборатории живых систем Пятигорского медико-фармацевтического института (ПМФИ) при контролируемых условиях окружающей среды: нормальном атмосферном давлении, температуре воздуха 22–24 °С, влажности воздуха 55–75 % и 12-часовом цикле день/ночь. Оперативные манипуляции выполнены под хлоралгидратной анестезией (внутрибрюшинное введение хлоралгидрата (PanReac AppliChem, Испания) в дозе 350 мг/кг). Эвтаназию животных осуществляли после анестезии и забора биоматериала путем цервикальной дислокации. Концепция работы была одобрена Локальным этическим комитетом ПМФИ (протокол от 07.07.2023 № 8).

monocarbonyl analogues of curcumin inhibit amyloidogenesis and cholinesterase activity *in vitro* and promote the restoration of mitochondrial function *in vivo*, which makes them promising objects for further study as agents of pathogenetic therapy of AD [14]. Considering the supposed multitarget action of these compounds, it is reasonable to study the effect of monocarbonyl curcuminoids on the course of apoptotic response in AD.

## AIM OF THE RESEARCH

Study of the effect of new monocarbonyl analogues of curcumin on changes in the apoptotic response in the brain under experimental AD simulated by injection of  $A\beta_{1-42}$  fragments into the hippocampus of laboratory animals.

## MATERIALS AND METHODS

**Experimental animals.** The experimental model of AD was reproduced on 50 mature female Wistar rats obtained from the Rappolovo laboratory animal nursery. During the study, all animals were kept in the premises of the laboratory of living systems of the Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute (PMPHI) under controlled environmental conditions: normal atmospheric pressure, air temperature 22–24 °C, air humidity 55–75% and 12-hour day/night cycle. Surgical manipulations were performed under chloral hydrate anesthesia (intraperitoneal injection of chloral hydrate (PanReac AppliChem, Spain) at a dose of 350 mg/kg). Animals were removed from the experiment after anesthesia and biomaterial collection via cervical dislocation. The concept of the study was approved by the Local Ethical Committee of PMPHI (protocol of 07.07.2023 No. 8). The study met the principles of EU Directive 2010/63 and ARRIVE 2.0.

**Study design.** All animals were divided into 5 groups of 10 animals each: sham-operated animals (SHAM) – a group of rats without pathology, negative control (NC) – a group of animals with simulated AD that were not treated and 3 groups of animals with simulated AD that received the reference drug and the substances studied.

The number of animals in the group was calculated according to the formula

$$n = (0.05t \cdot Sd)^2 / d^2,$$

where  $0.05t$  – variance of differences between groups at  $p = 0.05$ ;

$Sd$  – variance of differences between groups;

$d$  – mean difference when the expected value is significant.

Исследование соответствовало положениям Директивы ЕС 2010/63 и принципам ARRIVE 2.0.

**Дизайн исследования.** При подготовке эксперимента все животные были разделены на 5 групп по 10 особей: ложнооперированные животные (ЛО) – группа крыс без патологии, негативный контроль (НК) – группа животных с модельной патологией, которым лечебные мероприятия не проводились, и 3 группы животных с воспроизведенной БА, получавшие референтный препарат и исследуемые вещества.

Количество животных в группе рассчитывали по формуле

$$n = (0.05t \cdot Sd)^2 / d^2,$$

где 0.05t – дисперсия межгрупповых различий при  $p = 0.05$ ;

Sd – дисперсия межгрупповых различий;

d – средняя разница, когда ожидаемая величина является значимой.

Принимая, что  $n > 30$ ,  $t = 2$ ,  $Sd = 3$  и  $d = 2$ , рассчитанное значение  $n$  составляет не менее 9 особей в одной группе [15].

Введение изучаемых веществ и референта осуществляли после моделирования БА на протяжении 30 дней. По завершении курса лечения у крыс осуществляли забор биоматериала (кора больших полушарий и гиппокамп), в котором определяли концентрацию биомаркеров апоптоза: АИФ, активная форма каспазы 3, цитохром С и проапоптотический белок PUMA.

**Исследуемые соединения.** (1E,4E)-1,5-бис-(3,4,5-триметоксифенил)пента-1,4-диен-3-он (шифр AZBAX4) и (1E,4E)-1,5-бис-(2,4,6-триметоксифенил)пента-1,4-диен-3-он (шифр AZBAX6) были получены на кафедре органической химии ПМФИ. В качестве препарата сравнения использовали донепезил (Алзепил®, ЗАО «Фармацевтический завод Эгис», Россия). Введение анализируемых веществ и референта производили через атравматичный пероральный зонд однократно в течение суток в дозах 20 мг/кг (исследуемые соединения) и 50 мг/кг соответственно [14].

**Экспериментальная модель БА.** БА моделировали путем внутригиппокампальной инъекции агрегатов  $A\beta_{1-42}$ , полученных в ходе непрерывного перемешивания раствора  $A\beta_{1-42}$  в смеси фосфатный буфер (pH = 7.4)/диметилсульфоксид в соотношении 10:1. Далее крыс анестезировали, скальпировали теменную область и фиксировали в стереотаксической установке. Агрегаты  $A\beta_{1-42}$  вводили в конечной концентрации 1 ммоль/л в объеме 2 мкл с применением микродозатора и иглы G30 согласно следующим коор-

Assuming that  $n > 30$ ,  $t = 2$ ,  $Sd = 3$  and  $d = 2$ , the calculated value of  $n$  is at least 9 individuals in one group [15].

Administration of the studied substances and the reference drug was carried out after simulating AD for 30 days. At the end of the treatment course, samples was collected from rats (cerebral cortex and hippocampus), and the concentration of apoptosis biomarkers was determined: AIF, active form of caspase-3, cytochrome c and PUMA proapoptotic protein.

**Studied compounds.** (1E,4E)-1,5-bis(3,4,5-trimethoxyphenyl)penta-1,4-dien-3-one (code named AZBAX4) and (1E,4E)-1,5-bis(2,4,6-trimethoxyphenyl)penta-1,4-dien-3-one (code named AZBAX6) were obtained at the Department of Organic Chemistry, PMPHI. Donepezil (Alzepil®, Pharmaceutical Plant Egis, CJSC, Russia) was used as a reference drug. The studied substances and the reference drug were administered through an atraumatic oral tube once a day at doses of 20 mg/kg (test compounds) and 50 mg/kg, respectively [14].

**Experimental model of AD.** AD was simulated by intrahippocampal injection of  $A\beta_{1-42}$  aggregates obtained by continuous stirring of  $A\beta_{1-42}$  solution in phosphate buffer (pH = 7.4)/dimethyl sulfoxide mixture at a ratio of 10:1. Then rats were anesthetized, the parietal region was scalped and fixed in a stereotaxic device.  $A\beta_{1-42}$  aggregates were injected at a final concentration of 1 mmol/l in a volume of 2  $\mu$ l using a microdosing device and a G30 needle according to the following landmarks: antero-posterior – 3.8 mm, medial-lateral – 2 mm, dorsal-ventral – 2.6 mm from the bregma, which corresponded to the hippocampal region CA1. The needle was left in the injection site for 5 min, then the tissue topography was restored and a wound was sutured. A suture was treated with a 10% povidone iodine solution [16, 17].

**Preparation of samples for analysis.** On the 30th day of the study, the animals were decapitated, and then the brain was extracted and placed in a water bath at a temperature of 4°C. Next, the brain was dissected with a scalpel along the central sulcus, separating the hippocampus and the cerebral cortex, which were mechanically homogenized in a cold buffer solution of a 0.1% solution of bovine serum albumin (Sigma-Aldrich, Germany) + 215 mmol mannitol (Sigma-Aldrich, Germany) + 1 mmol sodium ethylene glycol tetraacetate (Sigma-Aldrich, Germany) + 75 mmol sucrose (Sigma-Aldrich, Germany) + 20 mmol 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (Sigma-Aldrich, Germany) (the tissue

динам: переднезадняя – 3.8 мм, медиально-латеральная – 2 мм, дорсально-вентральная – 2.6 мм от брегмы, что соответствовало региону CA1 гиппокампа. Иглу оставляли в месте введения 5 мин, после чего восстанавливали топографию тканей и ушивали рану. Шов обрабатывали 10% раствором повидон-йода [16, 17].

#### **Подготовка биоматериала для анализа.**

На 30-й день исследования животных декапитировали, затем извлекали головной мозг, который помещали на водяную баню с температурой 4 °С. После его иссекали скальпелем по средней борозде, отделяя гиппокамп и кору больших полушарий, которые механически гомогенизировали в холодном буферном растворе, состоящем из 0.1% раствора бычьего сывороточного альбумина (Sigma-Aldrich, Германия) + 215 ммоль маннита (Sigma-Aldrich, Германия) + 1 ммоль этиленгликольтетраацетата натрия (Sigma-Aldrich, Германия) + 75 ммоль сахарозы (Sigma-Aldrich, Германия) + 20 ммоль 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновой кислоты (Sigma-Aldrich, Германия) (соотношение масса ткани/объем буферного раствора составляло 1:7). Полученный гомогенат затем центрифугировали при 10 000 g в течение 15 мин. В полученном супернатанте методом иммуноферментного анализа оценивали изменение биомаркеров апоптоза.

**Оценка изменения концентрации биомаркеров апоптоза.** Концентрацию АИФ, каспазы 3, цитохрома С и белка PUMA в гиппокампе и коре больших полушарий крыс определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием видоспецифичных наборов реактивов. Наборы для анализа были предоставлены Cloud-Clone Corp. (США). Ход анализа соответствовал рекомендациям производителя. Аналитический сигнал регистрировали с применением микропланшетного ридера Infinite F50 (Tecan, Австрия).

**Статистический анализ.** Результаты обрабатывали методами вариационной статистики с применением возможностей программного комплекса StatPlus 7.0 (AnalystSoft Inc., США, лицензия 16887385). Полученные данные были проверены на нормальность распределения согласно критерию Шапиро – Уилка, однородность дисперсий определяли в тесте Левена. Для сравнения групп средних применяли параметрические методы ANOVA с пост-тестом Тьюки и непараметрические методы статического анализа – тест Краскела – Уоллиса с пост-парным сравнением в тесте Данна. Отличия считались статистически значимыми при  $p < 0.05$ .

weight/volume of the buffer solution ratio was 1:7). The obtained homogenate was then centrifuged at 10 000 g for 15 min. The change in apoptosis biomarkers was assessed in the obtained supernatant by enzyme immunoassay.

**Assessment of changes in the concentration of apoptosis biomarkers.** The concentration of AIF, caspase-3, cytochrome c, and PUMA protein in the hippocampus and cerebral cortex of rats was determined by the enzyme-linked immunosorbent assay using species-specific reagent kits. The assay kits were provided by Cloud-Clone Corp. (USA). The course of the analysis corresponded to the manufacturer's recommendations. The analytical signal was recorded using an Infinite F50 microplate reader (Tecan, Austria).

**Statistical analysis.** The results were processed by methods of variation statistics using the capabilities of StatPlus 7.0 software package (AnalystSoft Inc., USA, license 16887385). The obtained data were checked for the normality of distribution according to the Shapiro-Wilk test, the equality of variances was determined in the Levene's test. To compare groups of means, parametric the ANOVA with the Tukey's post-hoc test and nonparametric the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-hoc pairwise comparisons. The differences were considered statistically significant at  $p < 0.05$ .

## **RESULTS**

### **Effect of monocarbonyl analogues of curcumin on changes in the intrinsic apoptotic pathway in the hippocampus of rats with AD.**

When analyzing the changes in the concentration of biomarkers of the intrinsic pathway of apoptosis in the rat hippocampus, a significant decrease in the level of AIF was detected in the administration of compounds AZBAX4 (–31.1% ( $p < 0.05$ ) of NC), AZBAX6 (–15.3% ( $p < 0.05$ ) of NC) and donepezil (–14.5% ( $p < 0.05$ ) of NC). The cytochrome c concentration has also decreased when animals were administered AZBAX4 – by 43.5% ( $p < 0.05$ ) of NC, AZBAX6 – by 35.6% ( $p < 0.05$ ) of NC and donepezil – by 34.5% ( $p < 0.05$ ) of NC. The AIF and cytochrome c concentration in rats treated with AZBAX4 was lower than in animals injected with donepezil by 19.3% ( $p < 0.05$ ) and 13.8% ( $p < 0.05$ ), respectively, and in animals treated with AZBAX6 – by 19.6% ( $p < 0.05$ ) and 22.7% ( $p < 0.05$ ), respectively. It is also worth noting that the AIF and cytochrome c concentration in the hippocampus of the NC group was 2.6-fold ( $p < 0.05$ ) and 4.9-fold ( $p < 0.05$ ), respectively, higher in the SHAM group (Fig. 1).

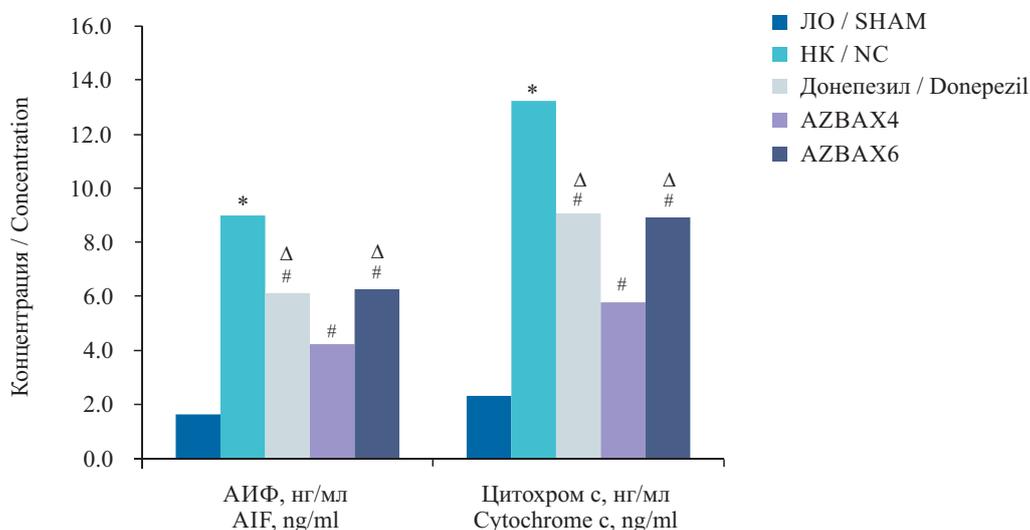
## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Влияние монокарбонильных аналогов куркумина на изменение реакций внутреннего апоптотического пути в гиппокампе крыс с БА.** При проведении анализа изменения концентрации биомаркеров внутреннего пути апоптоза в гиппокампе крыс было выявлено значимое снижение уровня АИФ на фоне применения соединений AZBAX4 (–31.1 % ( $p < 0.05$ ) от НК), AZBAX6 (–15.3 % ( $p < 0.05$ ) от НК) и донепезила (–14.5 % ( $p < 0.05$ ) от НК). При этом концентрация цитохрома С также снизилась при введении животным AZBAX4 – на 43.5 % ( $p < 0.05$ ) от НК, AZBAX6 – на 35.6 % ( $p < 0.05$ ) от НК и донепезила – на 34.5 % ( $p < 0.05$ ) от НК. Содержание АИФ и цитохрома С у крыс, получавших AZBAX4, было ниже такового у животных, которым вводили донепезил, на 19.3 % ( $p < 0.05$ ) и 13.8 % ( $p < 0.05$ ) соответственно, а также у животных, получавших AZBAX6, – на 19.6 % ( $p < 0.05$ ) и 22.7 % ( $p < 0.05$ ) соответственно. Также стоит отметить, что содержание АИФ и цитохрома С в гиппокампе группы НК крыс превосходило показатели ЛО животных в 2.6 раза ( $p < 0.05$ ) и 4.9 раза ( $p < 0.05$ ) соответственно (рис. 1).

## Effect of monocarbonyl analogues of curcumin on changes in the intrinsic apoptotic pathway in the cerebral cortex of rats with AD.

In the cerebral cortex, there was an increase in the concentration of AIF and cytochrome c in the NC group by 5.4-fold ( $p < 0.05$ ) and 5.7-fold ( $p < 0.05$ ), respectively, in comparison to the SHAM group. When AZBAX4 was administered, AIF and cytochrome c concentrations were significantly lower than in the untreated animal by 31.8% ( $p < 0.05$ ) and 31.4% ( $p < 0.05$ ), respectively. The following results were obtained in the group of animals receiving the reference drug: the levels of AIF and cytochrome c decreased by 31.9% ( $p < 0.05$ ) and 31.4% ( $p < 0.05$ ) compared to the group of untreated animals (Fig. 2), respectively. In the AZBAX6 administration, the AIF concentration decreased compared to the NC group by 30.3% ( $p < 0.05$ ), the cytochrome c concentration – by 32.5% ( $p < 0.05$ ). At the same time, the AIF and cytochrome c concentration in the AZBAX4 group was significantly lower than in rats of the donepezil group – by 30.6% ( $p < 0.05$ ) and 36.2% ( $p < 0.05$ ), respectively, and the AZBAX6 group – by 32.2% ( $p < 0.05$ ) and 35.1% ( $p < 0.05$ ), respectively.

## Effect of monocarbonyl analogues of curcumin on changes in the extrinsic apoptotic pathway in the cerebral cortex of rats with AD.



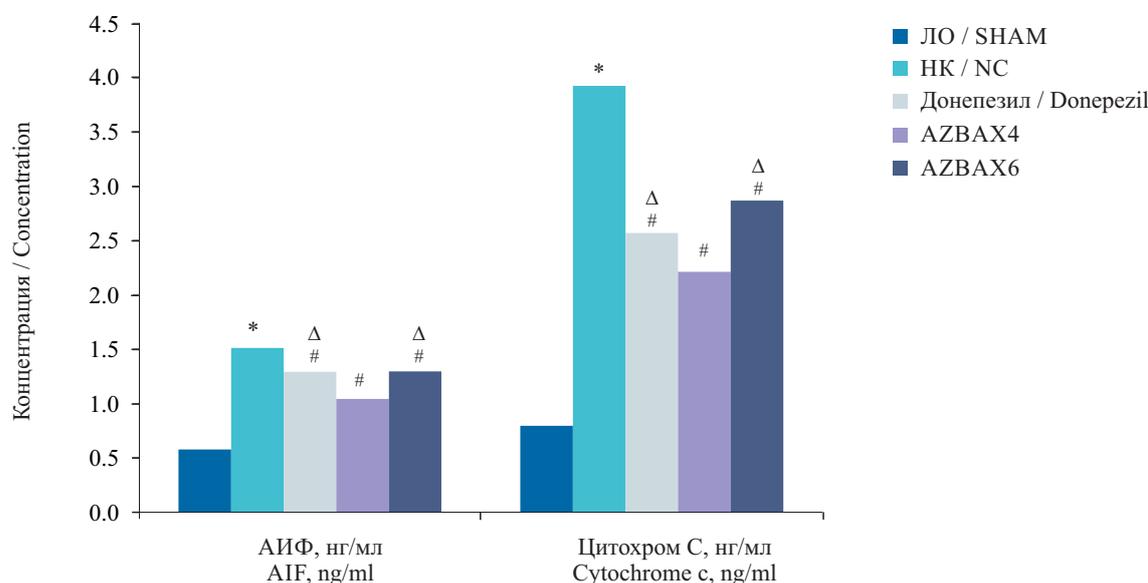
**Рис. 1.** Влияние монокарбонильных аналогов куркумина на изменение реакций внутреннего апоптотического пути в гиппокампе крыс с экспериментальной болезнью Альцгеймера (ЛО – ложнооперированные животные; НК – негативный контроль; Донепезил – группа животных, получавшая донепезил; AZBAX4 – группа животных, получавшая AZBAX 4; AZBAX6 – группа животных, получавшая AZBAX6; АИФ – апоптоз-индуцирующий фактор; \* достоверно относительно ЛО крыс (ANOVA, тест Тьюки,  $p < 0.05$ ); # достоверно относительно группы НК (ANOVA, тест Тьюки,  $p < 0.05$ ); Δ достоверно относительно группы крыс, получавших AZBAX4 (ANOVA, тест Тьюки,  $p < 0.05$ )

**Fig. 1.** Effect of monocarbonyl analogues of curcumin on changes in the intrinsic apoptotic pathway in the hippocampus of rats with experimental Alzheimer's disease (SHAM – sham-operated animals; NC – negative control; Donepezil – group of animals receiving donepezil; AZBAX4 – group of animals receiving AZBAX 4; AZBAX6 – group of animals receiving AZBAX6; AIF – apoptosis-inducing factor; \* significantly compared with the SHAM group (ANOVA, Tukey's test,  $p < 0.05$ ); # significantly, compared with the NC group (ANOVA, Tukey's test,  $p < 0.05$ ); Δ significantly compared with the AZBAX4 group (ANOVA, Tukey's test,  $p < 0.05$ )

**Влияние монокарбонильных аналогов куркумина на изменение реакций внутреннего апоптотического пути в коре больших полушарий крыс с БА.** В коре больших полушарий головного мозга наблюдалось повышение концентрации АИФ и цитохрома С в группе НК в 5.4 раза ( $p < 0.05$ ) и в 5.7 раза ( $p < 0.05$ ), в сравнении с показателями ЛО крыс соответственно. При введении AZBAX4 концентрация АИФ и цитохрома С была достоверно ниже, чем в группе нелеченых животных, на 31.8 % ( $p < 0.05$ ) и 31.4 % ( $p < 0.05$ ) соответственно. В группе животных, получавших референт, были получены следующие результаты: уровень АИФ и цитохрома С снижался на 31.9 % ( $p < 0.05$ ) и на 31.4 % ( $p < 0.05$ ) относительно группы нелеченых животных (рис. 2) соответственно. Показатели, полученные при применении AZBAX6: концентрация АИФ снизилась по отношению к группе НК на 30.3 % ( $p < 0.05$ ), цитохрома С – на 32.5 % ( $p < 0.05$ ). При этом содержание АИФ и цитохрома С в группе животных, получавших AZBAX4, было достоверно ниже, чем у крыс, которым вводили донепезил – на 30.6 % ( $p < 0.05$ ) и 36.2 % ( $p < 0.05$ ) соответственно, и животных, получавших AZBAX6, – на

**pathway in the hippocampus of rats with AD.** Based on the results of the experiment (Fig. 3), we have found that the levels of caspase 3 and PUMA in the NC group were 4.1-fold ( $p < 0.05$ ) and 5.0-fold ( $p < 0.05$ ) higher, respectively, compared to the SHAM group. Analyzing the data obtained during administration of the studied substances, it was found that in the AZBAX4 administration the concentration of caspase 3 and PUMA was lower than in the NC group by 48.1% ( $p < 0.05$ ) and 36.3% ( $p < 0.05$ ), respectively. At the same time, in animals treated with the AZBAX6 compound, the caspase 3 and PUMA protein concentration in hippocampal tissue decreased compared to untreated rats by 48.6% ( $p < 0.05$ ) and 34.3% ( $p < 0.05$ ), respectively. The donepezil administration led to a 46.4% ( $p < 0.05$ ) decrease (compared to the NC group) in the concentration of caspase 3 apoptosis biomarkers, and a 30.5% ( $p < 0.05$ ) decrease ( $p < 0.05$ ) in PUMA.

**Effect of monocarbonyl analogues of curcumin on changes in the extrinsic apoptotic pathway in the cerebral cortex of rats with AD.** When analyzing changes in the concentration of biomarkers of the external apoptotic pathway in the cerebral cortex of rats with AD (Fig. 4), it was



**Рис. 2.** Влияние монокарбонильных аналогов куркумина на изменение реакций внутреннего апоптотического пути в коре больших полушарий крыс с экспериментальной болезнью Альцгеймера (ЛО – ложнооперированные животные; НК – негативный контроль; Донепезил – группа животных, получавшая донепезил; AZBAX4 – группа животных, получавшая AZBAX4; AZBAX6 – группа животных, получавшая AZBAX6; АИФ – апоптоз-индуцирующий фактор; \* достоверно относительно ЛО крыс (ANOVA, тест Тьюки,  $p < 0.05$ ); # достоверно относительно группы НК (ANOVA, тест Тьюки,  $p < 0.05$ ); Δ достоверно относительно группы крыс, получавших AZBAX4 (ANOVA, тест Тьюки,  $p < 0.05$ )

**Fig. 2.** Effect of monocarbonyl analogues of curcumin on changes in the intrinsic apoptotic pathway in the cerebral cortex of rats with experimental Alzheimer's disease (SHAM – sham-operated animals; NC – negative control; Donepezil – group of animals receiving donepezil; AZBAX4 – group of animals receiving AZBAX4; AZBAX6 – group of animals receiving AZBAX6; AIF – apoptosis-inducing factor; \* significantly compared with the SHAM group (ANOVA, Tukey's test,  $p < 0.05$ ); # significantly compared with the NC group (ANOVA, Tukey's test,  $p < 0.05$ ); Δ significantly compared with the AZBAX4 group (ANOVA, Tukey's test,  $p < 0.05$ )

32.2 % ( $p < 0.05$ ) и 35.1 % ( $p < 0.05$ ) соответственно.

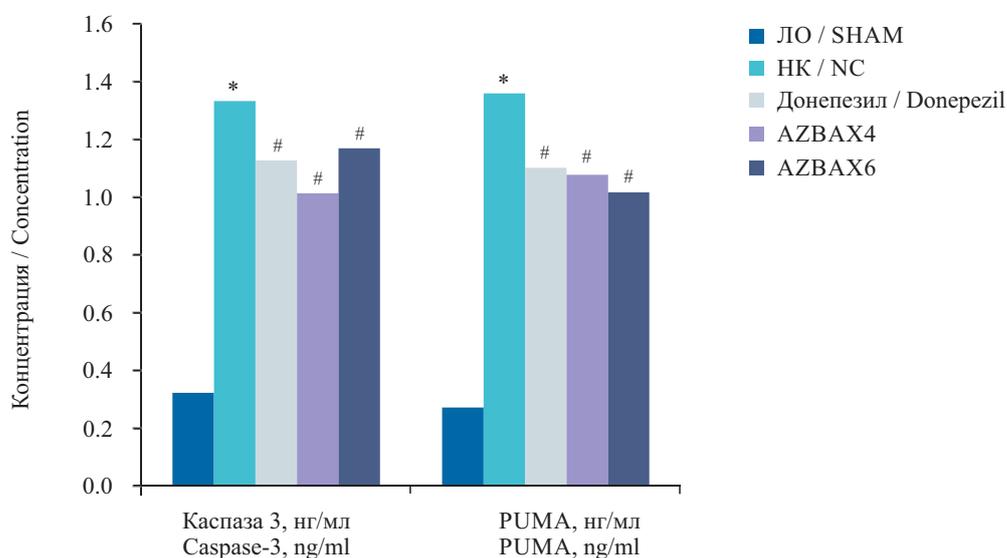
**Влияние монокарбонильных аналогов куркумина на изменение реакций внешнего апоптотического пути в гиппокампе крыс с БА.** По результатам данного экспериментального блока (рис. 3) было установлено, что уровень каспазы 3 и PUMA в группе НК превосходил показатели ЛО животных в 4.1 раза ( $p < 0.05$ ) и в 5.0 раза ( $p < 0.05$ ) соответственно. Анализируя данные, полученные при введении исследуемых веществ, было установлено, что на фоне применения AZBAX4 концентрация каспазы 3 и PUMA была ниже, чем в группе НК, на 48.1 % ( $p < 0.05$ ) и 36.3 % ( $p < 0.05$ ) соответственно. В то же время у животных, получавших соединение AZBAX6, содержание каспазы 3 и белка PUMA в ткани гиппокампа уменьшилось по отношению к нелеченым крысам на 48.6 % ( $p < 0.05$ ) и 34.3 % ( $p < 0.05$ ) соответственно. Применение донепезила приводило к снижению (относительно группы НК) концентрации биомаркеров апоптоза каспазы 3 на 46.4 % ( $p < 0.05$ ), PUMA – на 30.5 % ( $p < 0.05$ ).

**Влияние монокарбонильных аналогов куркумина на изменение реакций внешнего апоптотического пути в коре боль-**

found that the level of caspase-3 and PUMA protein in the NC group exceeded the indicators of SHAM group by 10.2 times ( $p < 0.05$ ) and 6.8 times ( $p < 0.05$ ), respectively. The concentration of caspase-3 in the administration of AZBAX4 and AZBAX6 decreased compared to the NC group by 48.1% ( $p < 0.05$ ) and by 48.6% ( $p < 0.05$ ), whereas in the administration of donepezil, this indicator decreased by 46.4% ( $p < 0.05$ ). The PUMA protein concentration in the groups of animals treated with AZBAX4 and AZBAX6 was 36.3% ( $p < 0.05$ ) and 34.3% ( $p < 0.05$ ) lower than in the group of untreated rats. In the administration of the reference drug, the concentration of PUMA decreased by 30.5% ( $p < 0.05$ ) in comparison with the same indicator of the NC group.

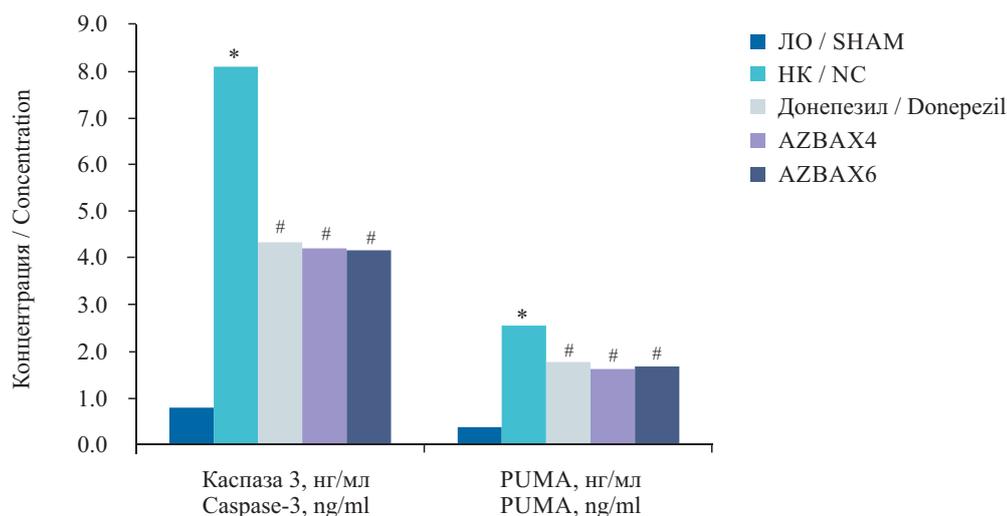
## DISCUSSION

Currently, the development of approaches to the AD treatment, which could stop or modify the course of the pathologic process, is a complex medical task. At present, the issue of developing new multitargeted agents for pathogenetic therapy of AD is acute. Among such promising compounds we can single out a group of monocarbonyl analogues of curcumin or diarylpentanoids characterized by relatively high neuroprotective potential. Thus,



**Рис. 3.** Влияние монокарбонильных аналогов куркумина на изменение реакций внешнего апоптотического пути в гиппокампе крыс с экспериментальной болезнью Альцгеймера (ЛО – ложнооперированные животные; НК – негативный контроль; Донепезил – группа животных, получавшая донепезил; AZBAX4 – группа животных, получавшая AZBAX4; AZBAX6 – группа животных, получавшая AZBAX6; \* достоверно относительно ЛО крыс (ANOVA, тест Тьюки,  $p < 0.05$ ); # достоверно относительно группы НК (ANOVA, тест Тьюки,  $p < 0.05$ )

**Fig. 3.** Effect of monocarbonyl analogues of curcumin on changes in the extrinsic apoptotic pathway in the hippocampus of rats with experimental Alzheimer's disease (SHAM – sham-operated animals; NC – negative control; Donepezil – group of animals receiving donepezil; AZBAX4 – group of animals receiving AZBAX4; AZBAX6 – group of animals receiving AZBAX6; \*significantly compared to the SHAM group (ANOVA, Tukey's test,  $p < 0.05$ ); #significantly compared to the NC group (ANOVA, Tukey's test,  $p < 0.05$ )



**Рис. 4.** Влияние монокарбонильных аналогов куркумина на изменение реакций внешнего апоптотического пути в коре больших полушарий крыс с экспериментальной болезнью Альцгеймера (ЛО – ложнооперированные животные; НК – негативный контроль; Донеpezил – группа животных, получавшая донеpezил; AZBAX4 – группа животных, получавшая AZBAX4; AZBAX6 – группа животных, получавшая AZBAX6; \* достоверно относительно ЛО крыс (ANOVA, тест Тьюки,  $p < 0.05$ ); #достоверно относительно группы НК (ANOVA, тест Тьюки,  $p < 0.05$ )

**Fig. 4.** Effect of monocarbonyl analogues of curcumin on changes in the extrinsic apoptotic pathway in the cerebral cortex of rats with experimental Alzheimer’s disease (SHAM – sham-operated animals; NC – negative control; Donepezil – group of animals receiving donepezil; AZBAX4 – group of animals receiving AZBAX4; AZBAX6 – group of animals receiving AZBAX6; \*significantly compared to the SHAM group (ANOVA, Tukey’s test,  $p < 0.05$ ); #significantly compared to the NC group (ANOVA, Tukey’s test,  $p < 0.05$ )

**ших полушарий крыс с БА.** При проведении анализа изменения концентрации биомаркеров внешнего апоптотического пути в коре больших полушарий у крыс с БА (рис. 4) было установлено, что уровень каспазы 3 и белка PUMA в группе НК превосходил показатели ЛО животных в 10.2 раза ( $p < 0.05$ ) и 6.8 раза ( $p < 0.05$ ) соответственно. Далее продемонстрировано, что концентрация каспазы 3 при введении AZBAX4 и AZBAX6 снижалась относительно группы НК на 48.1 % ( $p < 0.05$ ) и на 48.6 % ( $p < 0.05$ ), тогда как на фоне введения донеpezила данный показатель уменьшился на 46.4 % ( $p < 0.05$ ). Содержание белка PUMA в группах животных, получавших AZBAX4 и AZBAX6, было на 36.3 % ( $p < 0.05$ ) и 34.3 % ( $p < 0.05$ ) ниже, чем в группе нелеченых крыс. На фоне введения референта концентрация PUMA снизилась на 30.5 % ( $p < 0.05$ ) в сравнении с аналогичным показателем группы НК.

## ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время разработка подходов к лечению БА, которые могли бы остановить или модифицировать течение патологического процесса, является сложной медицинской задачей. На сегодняшний момент остро стоит вопрос о разработке новых политаргетных средств для

Hussain et al. (2021) demonstrated that some monocarbonyl curcuminoids have anticholinesterase activity both *in vitro* and *in vivo* in a model of AD induced by administration of scopolamine [18]. Our study showed that the administration of monocarbonyl curcuminoids code named AZBAX4 and AZBAX6 contributed to a decrease in the level of the main biomarkers of apoptosis in the cerebral cortex and hippocampus in rats with experimental AD in a sporadic manner. Such changes may reflect significant effects of the analyzed compounds on the course of apoptotic response, affecting both the intrinsic and extrinsic apoptotic pathway. At the same time, the decrease in the intensity of reactions of the extrinsic apoptotic pathway can be concluded by the decrease of the AIF and cytochrome c concentration, which may indirectly reflect the previously described effect of the analyzed compounds on the functional state of cell mitochondria [14]. It is known that the formation of mitochondrial proapoptotic molecules of AIF and cytochrome c is closely related to the intensity of oxidative phosphorylation (OXPHOS) reactions in the mitochondrial respiratory chain. In fact, both molecules are highly conserved proteins performing functions of oxidoreductase; whose deletion from the OXPHOS chain activates a series of enzymes – effectors of

патогенетической терапии БА. Среди таких перспективных соединений можно выделить группу монокарбонильных аналогов куркумина или диарилпентаноидов, отличающихся относительно высоким нейропротекторным потенциалом. Так, Н. Hussain et al. (2021) продемонстрировали, что некоторые монокарбонильные куркуминоиды обладают антихолинэстеразной активностью как в условиях *in vitro*, так и *in vivo* на модели БА, вызванной курсовым введением скополамина [18]. Проведенное исследование показало, что применение монокарбонильных куркуминоидов под шифрами AZBAX4 и AZBAX6 способствовало снижению уровня основных биомаркеров апоптоза в коре больших полушарий и гиппокампе у крыс с экспериментальной БА спорадического типа. Подобные изменения могут отражать значимое воздействие анализируемых соединений на течение реакций апоптоза, затрагивая при этом внутренний и внешний апоптотический путь. При этом о снижении интенсивности реакций внутреннего пути апоптоза можно судить по уменьшению концентрации АИФ и цитохрома С, что косвенно может отражать описанное ранее влияние анализируемых соединений на функциональное состояние митохондрий клетки [14]. Известно, что образование митохондриальных проапоптотических молекул АИФ и цитохрома С тесно связано с интенсивностью реакций окислительного фосфорилирования, происходящих в митохондриальной дыхательной цепи. Фактически обе молекулы представляют собой высококонсервативные белки, выполняющие оксидоредуктазные функции, при делеции которых из цепи ОХРНOS активируется ряд ферментов – эффекторов апоптоза, например, эндонуклеаза G, вызывающая разрывы нити ДНК и гибель клетки [19]. Кроме того, как показали N. Novo et al. (2022), АИФ *per se* обладает эндонуклеазной активностью и может инициировать разрывы ДНК без участия специфических эндонуклеаз [20]. При этом, как показала оценка влияния анализируемых веществ на изменение митохондриальной функции у крыс с БА, соединение AZBAX4 проявляло более выраженное митохондриально-ориентированное действие, чем вещество AZBAX6 и референт донепезил [14], что может объяснить достоверное уменьшение интенсивности реакций внутреннего пути апоптоза у крыс, получавших AZBAX4, по отношению к животным, которым вводили донепезил и AZBAX6.

Внешний путь апоптоза непосредственно связан с активацией TRAIL –рецепторов «смерти» с

apoptosis such as endonuclease G, which causes DNA strand breaks and cell death [19]. In addition, as shown by Novo et al. (2022), AIF has endonuclease activity *per se* and can initiate DNA breaks without the participation of specific endonucleases [20]. At the same time, the assessment of the effect of the analyzed substances on changes in mitochondrial function in rats with AD showed the compound AZBAX4 exhibited a more pronounced mitochondria-oriented effect than the substance AZBAX6 and the reference drug, donepezil [14], which can explain the significant decrease in the intensity of reactions of the intrinsic apoptotic pathway in rats treated with AZBAX4 in relation to animals who received donepezil and AZBAX6.

The extrinsic pathway of apoptosis is directly related to the activation of TRAIL death receptors, followed by initiating a cascade of reactions PUMA → caspase-12 → caspase-3 and DNA strand breaks [13]. Considering that the main ligand of TRAIL receptors is TNF- $\alpha$ , the decrease in the intensity of caspase-dependent apoptosis under the action of the analyzed substances may be associated with a decrease in the concentration of this cytokine, which was also demonstrated in earlier studies [21]. An important feature of the action of the monocarbonyl analogues of curcumin studied is the inhibition of apoptotic response both in the hippocampus and in cerebral cortex, which can serve as a predisposing factor for the restoration of cognitive functions [22].

## CONCLUSION

The study showed that the use of monocarbonyl analogues of curcumin AZBAX4 and AZBAX6 contributes to a decrease in the intensity of apoptotic response in the tissue of the hippocampus and cerebral cortex in rats with experimental AD. In addition, the compound AZBAX4 possessed the most pronounced antiapoptotic potential, in administration of which, the indicators characterizing the activity of the intrinsic apoptotic pathway were significantly lower than in the administration of AZBAX6 and donepezil.

**Author contributions.** The two authors contributed equally to the conception, research and preparation of the article, and read and approved the final version before publication.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

последующей инициацией каскада реакций PUMA → каспаза 12 → каспаза 3 и разрывами в цепи ДНК [13]. Учитывая, что основным лигандом рецепторов TRAIL является ФНО-α, уменьшение интенсивности каспаза-зависимого апоптоза под действием анализируемых веществ может быть связано с уменьшением содержания данного цитокина, что также было продемонстрировано в ранее проведенных исследованиях [21]. Важной особенностью действия исследуемых монокарбонильных аналогов куркумина является подавление реакций апоптоза, как в гиппокампе, так и в коре больших полушарий, что может служить предрасполагающим фактором для восстановления когнитивных функций [22].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование показало, что курсовое применение монокарбонильных аналогов

куркумина AZBAH4 и AZBAH6 способствует уменьшению интенсивности реакций апоптоза в ткани гиппокампа и коры больших полушарий у крыс с экспериментальной БА. При этом наиболее выраженным антиапоптотическим потенциалом обладало соединение AZBAH4, при введении которого показатели, характеризующие активность внутреннего апоптотического пути, были достоверно ниже, чем в случае применения AZBAH6 и донепезила.

**Вклад авторов.** Все авторы внесли равноценный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dhapola R., Hota S.S., Sarma P. et al. Recent advances in molecular pathways and therapeutic implications targeting neuroinflammation for Alzheimer's disease // *Inflammopharmacology*. 2021;29(6):1669-1681. DOI: 10.1007/s10787-021-00889-6.
2. Serrano-Pozo A., Growdon J.H. Is Alzheimer's disease risk modifiable? // *J. Alzheimer's Dis.* 2019;67(3):795-819. DOI: 10.3233/JAD181028.
3. 2022 Alzheimer's disease facts and figures // *Alzheimer's Dement.* 2022;18(4):700-789. DOI: 10.1002/alz.12638.
4. Barage S.H., Sonawane K.D. Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease // *Neuropeptides*. 2015;52:1-18. DOI: 10.1016/j.npep.2015.06.008.
5. Scheltens P., De Strooper B., Kivipelto M. et al. Alzheimer's disease // *Lancet*. 2021;397(10284):1577-1590. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)32205-4.
6. Song L., Yao L., Zhang L. et al. Schizandrol A protects against Aβ1-42-induced autophagy via activation of PI3K/AKT/mTOR pathway in SH-SY5Y cells and primary hippocampal neurons // *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 2020;393(9):1739-1752. DOI: 10.1007/s00210-019-01792-2.
7. Thakur S., Dhapola R., Sarma P. et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: current progress in molecular signaling and therapeutics // *Inflammation*. 2023;46(1):1-17. DOI: 10.1007/s10753-022-01721-1.
8. Wang H., Sun M., Li W. et al. Biomarkers associated with the pathogenesis of Alzheimer's disease // *Front. Cell. Neurosci.* 2023;17:1279046. DOI: 10.3389/fncel.2023.1279046.
9. Paquet C., Nicoll J.A., Love S. et al. Downregulated apoptosis and autophagy after anti-Aβ immunotherapy in Alzheimer's disease // *Brain Pathol.* 2018;28(5):603-610. DOI: 10.1111/bpa.12567.
10. Morley J.E., Farr S.A., Nguyen A.D. Alzheimer disease // *Clin. Geriatr. Med.* 2018;34(4):591-601. DOI: 10.1016/j.cger.2018.06.006.

## REFERENCES

1. Dhapola R., Hota S.S., Sarma P. et al. Recent advances in molecular pathways and therapeutic implications targeting neuroinflammation for Alzheimer's disease. *Inflammopharmacology*. 2021;29(6):1669-1681. DOI: 10.1007/s10787-021-00889-6.
2. Serrano-Pozo A., Growdon J.H. Is Alzheimer's disease risk modifiable? *J. Alzheimer's Dis.* 2019;67(3):795-819. DOI: 10.3233/JAD181028.
3. 2022 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's Dement.* 2022;18(4):700-789. DOI: 10.1002/alz.12638.
4. Barage S.H., Sonawane K.D. Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. *Neuropeptides*. 2015;52:1-18. DOI: 10.1016/j.npep.2015.06.008.
5. Scheltens P., De Strooper B., Kivipelto M. et al. Alzheimer's disease. *Lancet*. 2021;397(10284):1577-1590. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)32205-4.
6. Song L., Yao L., Zhang L. et al. Schizandrol A protects against Aβ1-42-induced autophagy via activation of PI3K/AKT/mTOR pathway in SH-SY5Y cells and primary hippocampal neurons. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 2020;393(9):1739-1752. DOI: 10.1007/s00210-019-01792-2.
7. Thakur S., Dhapola R., Sarma P. et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: current progress in molecular signaling and therapeutics. *Inflammation*. 2023;46(1):1-17. DOI: 10.1007/s10753-022-01721-1.
8. Wang H., Sun M., Li W. et al. Biomarkers associated with the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Front. Cell. Neurosci.* 2023;17:1279046. DOI: 10.3389/fncel.2023.1279046.
9. Paquet C., Nicoll J.A., Love S. et al. Downregulated apoptosis and autophagy after anti-Aβ immunotherapy in Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* 2018;28(5):603-610. DOI: 10.1111/bpa.12567.
10. Morley J.E., Farr S.A., Nguyen A.D. Alzheimer disease. *Clin. Geriatr. Med.* 2018;34(4):591-601. DOI: 10.1016/j.cger.2018.06.006.

11. Sugiura R., Satoh R., Takasaki T. ERK: A double-edged sword in cancer. ERK-dependent apoptosis as a potential therapeutic strategy for cancer // *Cells*. 2021;10(10):2509. DOI: 10.3390/cells10102509.
12. Erekat N.S. Apoptosis and its therapeutic implications in neurodegenerative diseases // *Clin. Anat.* 2022;35(1):65-78. DOI: 10.1002/ca.23792.
13. Kumari S., Dhapola R., Reddy D.H. Apoptosis in Alzheimer's disease: insight into the signaling pathways and therapeutic avenues // *Apoptosis*. 2023;28(7-8):943-957. DOI: 10.1007/s10495-023-01848-y.
14. Поздняков Д.И., Вихорь А.А., Руковицина В.М., Оганесян Э.Т. Коррекция митохондриальной дисфункции триметокси-замещенными монокарбонильными аналогами куркумина в условиях экспериментальной болезни Альцгеймера // *Фармация и фармакология*. 2023;11(6):471-481. DOI: 10.19163/2307-9266-2023-11-6-471-481.
15. Mead R., Gilmour S.G., Mead A. *Statistical Principles for the Design of Experiments: Applications to Real Experiments*. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 2012.
16. Paxinos G., Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, 2007.
17. Rosales-Corral S.A., Lopez-Armas G., Cruz-Ramos J. et al. Alterations in lipid levels of mitochondrial membranes induced by amyloid- $\beta$ : a protective role of melatonin // *Int. J. Alzheimer's Dis.* 2012;2012:459806. DOI:10.1155/2012/459806.
18. Hussain H., Ahmad S., Shah S.W.A. et al. Neuroprotective potential of synthetic mono-carbonyl curcumin analogs assessed by molecular docking studies // *Molecules*. 2021;26(23):7168. DOI: 10.3390/molecules26237168.
19. Zong L., Liang Z. Apoptosis-inducing factor: a mitochondrial protein associated with metabolic diseases – a narrative review // *Cardiovasc. Diagn. Ther.* 2023;13(3):609-622. DOI: 10.21037/cdt-23-123.
20. Novo N., Romero-Tamayo S., Marcuello C. et al. Beyond a platform protein for the degradosome assembly: The Apoptosis-Inducing Factor as an efficient nuclease involved in chromatinolysis // *PNAS Nexus*. 2022;2(2):pgac312. DOI: 10.1093/pnasnexus/pgac312.
21. Вихорь А.А., Поздняков Д.И. Коррекция реакции нейровоспаления монокарбонильными аналогами куркумина в клетках гиппокампа и коры больших полушарий головного мозга у крыс с экспериментальной болезнью Альцгеймера // *Волжские берега: Современные технологии в медицине, биологии и ветеринарии: сб. материалов I Международного научно-практического форума; Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского. Саратов, 2024. С. 17–18.*
22. Li S., Stern A.M. Bioactive human Alzheimer brain soluble A $\beta$ : pathophysiology and therapeutic opportunities // *Mol. Psychiatry*. 2022;27(8):3182-3191. DOI: 10.1038/s41380-022-01589-5.
11. Sugiura R., Satoh R., Takasaki T. ERK: A double-edged sword in cancer. ERK-dependent apoptosis as a potential therapeutic strategy for cancer. *Cells*. 2021;10(10):2509. DOI: 10.3390/cells10102509.
12. Erekat N.S. Apoptosis and its therapeutic implications in neurodegenerative diseases. *Clin. Anat.* 2022;35(1):65-78. DOI: 10.1002/ca.23792.
13. Kumari S., Dhapola R., Reddy D.H. Apoptosis in Alzheimer's disease: insight into the signaling pathways and therapeutic avenues. *Apoptosis*. 2023;28(7-8):943-957. DOI: 10.1007/s10495-023-01848-y.
14. Pozdnyakov D.I., Vikhor A.A., Rukovitsina V.M., Oganesyanyan E.T. Correction of mitochondrial dysfunction with trimethoxy-substituted monocarbonyl curcumin analogues in experimental Alzheimer's disease. *Pharmacy and Pharmacology*. 2023;11(6):471-481. DOI: 10.19163/2307-9266-2023-11-6-471-481. (In Russ.)
15. Mead R., Gilmour S.G., Mead A. *Statistical Principles for the Design of Experiments: Applications to Real Experiments*. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 2012.
16. Paxinos G., Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, 2007.
17. Rosales-Corral S.A., Lopez-Armas G., Cruz-Ramos J. et al. Alterations in lipid levels of mitochondrial membranes induced by amyloid- $\beta$ : a protective role of melatonin. *Int. J. Alzheimer's Dis.* 2012;2012:459806. DOI:10.1155/2012/459806.
18. Hussain H., Ahmad S., Shah S.W.A. et al. Neuroprotective potential of synthetic mono-carbonyl curcumin analogs assessed by molecular docking studies. *Molecules*. 2021;26(23):7168. DOI: 10.3390/molecules26237168.
19. Zong L., Liang Z. Apoptosis-inducing factor: a mitochondrial protein associated with metabolic diseases – a narrative review. *Cardiovasc. Diagn. Ther.* 2023;13(3):609-622. DOI: 10.21037/cdt-23-123.
20. Novo N., Romero-Tamayo S., Marcuello C. et al. Beyond a platform protein for the degradosome assembly: The Apoptosis-Inducing Factor as an efficient nuclease involved in chromatinolysis. *PNAS Nexus*. 2022;2(2):pgac312. DOI: 10.1093/pnasnexus/pgac312.
21. Vikhor A.A., Pozdnyakov D.I. (2024). Correction of the neuroinflammation reaction with monocarbonyl analogues of curcumin in cells of the hippocampus and cerebral cortex in rats with experimental Alzheimer's disease. In *Volga Shores: Modern Technologies in Medicine, Biology and Veterinary Medicine: collection of writings of the I International Scientific and Practical Forum; Saratov State Medical University named after V.I. Razumovsky*. Saratov. P. 17–18. (In Russ.)
22. Li S., Stern A.M. Bioactive human Alzheimer brain soluble A $\beta$ : pathophysiology and therapeutic opportunities. *Mol. Psychiatry*. 2022;27(8):3182-3191. DOI: 10.1038/s41380-022-01589-5.

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

**Поздняков Дмитрий Игоревич** – канд. фармацевт. наук, доцент, заведующий кафедрой фармакологии с курсом клинической фармакологии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России; ведущий научный сотрудник Пятигорского государственного научно-исследовательского института курортологии – филиала ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр медицинской реабилитации и курортологии Федерального медико-биологического агентства», Пятигорск, Россия. ORCID: 0000-0002-5595-8182.

**Вихорь Анастасия Алексеевна** – студентка 5-го курса Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России, Пятигорск, Россия. ORCID: 0009-0009-9892-0326.

## ABOUT THE AUTHORS

**Dmitry I. Pozdnyakov** – Cand. Sci. (Pharmaceut.), Associate Professor, Head, Department of Pharmacology with a course of Clinical Pharmacology, Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute, Branch of the Volgograd State Medical University; Leading Researcher, Pyatigorsk State Research Institute of Balneology, Branch of the Federal Scientific and Clinical Center for Medical Rehabilitation and Balneology, Pyatigorsk, Russia. ORCID: 0000-0002-5595-8182.

**Anastasia A. Vikhor** – 5th year Student, Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute, Branch of the Volgograd State Medical University, Pyatigorsk, Russia. ORCID: 0009-0009-9892-0326.

## Структурная реорганизация миокарда при COVID-19

С.В. Савченко<sup>1</sup>, А.Н. Ламанов<sup>1</sup>, Б.И. Айзикович<sup>2</sup>, В.А. Грицингер<sup>1</sup>, Н.П. Бгатова<sup>3</sup>,  
Ю.С. Таскаева<sup>3</sup>, Л.Л. Позднякова<sup>4</sup>, О.М. Шишкова<sup>4</sup>, Я.С. Ульянова<sup>4</sup>, Е.И. Филина<sup>4</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия

<sup>2</sup>ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

<sup>3</sup>Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

<sup>4</sup>ГБУЗ НСО «Городская инфекционная клиническая больница № 1» Новосибирск, Россия

### АННОТАЦИЯ

**В в е д е н и е .** Развитие новой коронавирусной инфекции (COVID-19) не ограничивается поражением органов дыхания. Неблагоприятные исходы у пациентов с COVID-19 могут быть связаны с поражением сердца.

**Ц е л ь .** Изучение структурных изменений миокарда и молекулярно-биологических характеристик эндотелия кровеносных капилляров при тяжелых формах COVID-19.

**М а т е р и а л ы и м е т о д ы .** Проведен анализ сведений, изложенных в медицинской документации – картах стационарного больного 73 умерших с двухсторонней вирусной полисегментарной пневмонией, вызванной вирусом SARS-CoV-2, а также данных 43 аутопсий пациентов, умерших («острая коронарная смерть») в период с сентября 2020 по июль 2021 г. Выполнена оценка некоторых клинико-лабораторных данных (объем поражения легких, С-реактивный протеин, тропонин I, D-димер, фракция выброса левого желудочка и др.), структурных изменений миокарда и молекулярно-биологических характеристик (CD31, CD34) эндотелия кровеносных капилляров при тяжелых формах COVID-19.

**Р е з у л ь т а т ы .** Анализ клинико-лабораторных данных показал, что снижение сократительной способности миокарда при тяжелых формах COVID-19 в связи с распространенным поражением легких сопровождалось повышением уровня С-реактивного протеина, D-димера, тропонина I и свидетельствовало об остром повреждении миокарда. По данным ЭКГ-контроля и эхокардиографии отмечали нарушение реполяризации и снижение сократительной способности, что сопровождалось снижением фракции выброса на 32 %. Более чем в 70 % случаев на ЭКГ наблюдали различные аритмические нарушения (фибрилляция предсердий и др.).

При световой микроскопии было отмечено наличие сладж-феномена, а также набухания, десквамации и пролиферации эндотелия кровеносных капилляров, образование диапедезных и очаговых кровоизлияний, местами краевое стояние лейкоцитов и их миграция за пределы сосудистого русла. В просвете сосудов наблюдали фибриновые массы. При поляризационной микроскопии, наряду с контрактурами кардиомиоцитов, наблюдали группы клеток с миоцитоллизом и первичным глыбчатым распадом. Во всех наблюдениях был выявлен липофусциноз кардиомиоцитов. При иммуногистохимическом исследовании отмечали выраженное снижение уровня экспрессии белков – маркеров кровеносных сосудов CD31 (PECAM-1) и CD34.

**З а к л ю ч е н и е .** Проведенный клинико-морфологический анализ при тяжелых формах при COVID-19 позволил получить новые данные о дистрофических изменениях миокарда и структуры эндотелиоцитов кровеносных капилляров, которые могут быть положены в основу методических подходов для изучения механизмов развития сердечной недостаточности при новой коронавирусной инфекции.

**Ключевые слова:** COVID-19, миокард, эндотелий, морфология.

**Образец цитирования:** Савченко С.В., Ламанов А.Н., Айзикович Б.И., Грицингер В.А., Бгатова Н.П., Таскаева Ю.С., Позднякова Л.Л., Шишкова О.М., Ульянова Я.С., Филина Е.И. Структурная реорганизация миокарда при COVID-19 // Journal of Siberian Medical Sciences. 2024;8(3):91-101. DOI: 10.31549/2542-1174-2024-8-3-91-101

Поступила в редакцию 05.08.2024  
Прошла рецензирование 29.08.2024  
Принята к публикации 02.09.2024

Автор, ответственный за переписку  
Савченко Сергей Владимирович: ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России. 630091, г. Новосибирск, Красный просп., 52.  
E-mail: dr.serg62@yandex.ru

Received 05.08.2024  
Revised 29.08.2024  
Accepted 02.09.2024

Corresponding author  
Sergey V. Savchenko: Novosibirsk State Medical University, 52, Krasny prosp., Novosibirsk, 630091, Russia.  
E-mail: dr.serg62@yandex.ru

## Structural reorganization of the myocardium in COVID-19

S.V. Savchenko<sup>1</sup>, A.N. Lamanov<sup>1</sup>, B.I. Aizikovich<sup>2</sup>, V.A. Gritsinger<sup>1</sup>, N.P. Bgatova<sup>3</sup>, Yu.S. Taskaeva<sup>3</sup>, L.L. Pozdnyakova<sup>4</sup>, O.M. Shishkova<sup>4</sup>, Ya.S. Ulyanova<sup>4</sup>, E.I. Filina<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup>Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

<sup>3</sup>Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetic, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

<sup>4</sup>City Infectious Clinical Hospital No. 1, Novosibirsk, Russia

### ABSTRACT

**I n t r o d u c t i o n .** The development of a novel coronavirus infection (COVID-19) is not limited to respiratory damage. Adverse outcomes in patients with COVID-19 may be associated with cardiac damage.

**A i m .** Study of the structural changes in the myocardium and the molecular biological characteristics of the endothelium of blood capillaries in severe forms of COVID-19.

**M a t e r i a l s a n d m e t h o d s .** An analysis of the medical documentation – inpatient records of 73 deceased with bilateral multisegmental viral pneumonia caused by the SARS-CoV-2 virus, as well as data from 43 autopsies of patients who died (sudden coronary death) between September 2020 to July 2021, was performed. An assessment of some clinical and laboratory data (degree of lung damage; levels of C-reactive protein, troponin I, D-dimer; left ventricular ejection fraction, etc.), structural changes in the myocardium and molecular biological characteristics (CD31, CD34) of the endothelium of blood capillaries in severe forms of COVID-19 was carried out.

**R e s u l t s .** The analysis of clinical and laboratory data has shown that a decrease in myocardial contractility in severe forms of COVID-19 due to an extensive lung damage was accompanied by an increase in the level of C-reactive protein, D-dimer, troponin I and indicated acute myocardial damage. According to electrocardiography (ECG) monitoring and echocardiography, repolarization disorders and a decrease in myocardial contractility were noted, which was accompanied by a decrease in ejection fraction by 32%. In more than 70% of cases, various arrhythmic disorders (atrial fibrillation, etc.) were observed during ECG.

Light microscopy revealed the presence of sludge phenomenon, as well as swelling, desquamation and proliferation of the endothelium of blood capillaries, formation of diapedetic and focal hemorrhages, in some places leukocyte margination and their migration beyond vascular bed. Fibrin masses were observed in the lumen of blood vessels. Polarization microscopy, along with contractures in cardiomyocytes, revealed groups of cells with myocytolysis and primary granularity. In all observations, lipofuscinosis of cardiomyocytes was detected. Immunohistochemical examination showed a marked decrease in the expression level of CD31 (PECAM-1) and CD34 proteins – markers of blood vessels.

**C o n c l u s i o n .** The performed clinical and morphological analysis in severe forms of COVID-19 allowed us to obtain new data on degenerative changes in the myocardium and the structure of endothelial cells of blood capillaries, which can be used as a basis for methodological approaches to studying the mechanisms of development of heart failure in a novel coronavirus infection.

**Keywords:** COVID-19, myocardium, endothelium, morphology.

**Citation example:** Savchenko S.V., Lamanov A.N., Aizikovich B.I., Gritsinger V.A., Bgatova N.P., Taskaeva Yu.S., Pozdnyakova L.L., Shishkova O.M., Ulyanova Ya.S., Filina E.I. Structural reorganization of the myocardium in COVID-19. *Journal of Siberian Medical Sciences*. 2024;8(3):91-101. DOI: 10.31549/2542-1174-2024-8-3-91-101

### ВВЕДЕНИЕ

На современном этапе мультидисциплинарного изучения инфекционного заболевания, вызванного вирусом SARS-CoV-2, установлено, что развитие новой коронавирусной инфекции (COVID-19) не ограничивается поражением органов дыхания [1–4]. Неблагоприятные исходы у пациентов с COVID-19, наряду с поражением легких, могут быть связаны с развитием

### INTRODUCTION

At the current stage of multidisciplinary study of the infectious disease caused by the SARS-CoV-2 virus, it has been established that the development of a novel coronavirus infection (COVID-19) is not limited to damage to the respiratory organs [1–4]. Adverse outcomes in patients with COVID-19, along with lung damage, may be associated with the development of complications due to cardiac damage

осложнений, обусловленных поражением сердца [5–8]. Развитие при COVID-19 разнообразной клинической симптоматики, ассоциированное с сердечной недостаточностью, связывают с генерализованным поражением сосудистого русла и развитием прогрессирующих микроциркуляторных расстройств миокарда [9–12]. Получение новых данных о структурных изменениях эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда может быть положено в основу методических подходов для изучения механизмов развития сердечной недостаточности при COVID-19.

### ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение структурных изменений миокарда и молекулярно-биологических характеристик эндотелия кровеносных капилляров при тяжелых формах COVID-19.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

На первом этапе исследования был проведен анализ данных медицинских документов – карт стационарного больного 73 умерших с двухсторонней вирусной полисегментарной пневмонией, вызванной вирусом SARS-CoV-2, в период с сентября 2020 по июль 2021 г. в ГБУЗ НСО «Городская инфекционная клиническая больница № 1» г. Новосибирска. Во всех наблюдениях новая коронавирусная инфекция (COVID-19) у пациентов протекала в тяжелой форме. Инфицирование вирусом SARS-CoV-2 было верифицировано прижизненно с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Пациенты получали лечение в полном соответствии с «Временными клиническими рекомендациями по лечению новой коронавирусной инфекции» (версии 9–11, ноябрь 2020 г. – июль 2021 г.).

Из числа умерших в клинике 56.16 % составили мужчины (41 чел.) и 43.4 % (32 чел.) – женщины. Лиц до 65 лет среди умерших было 63.2 %, старше 65 лет – 36.8 %. У большинства пациентов (79.45 %, 58 чел.) имелись коморбидные заболевания в стадии компенсации, среди которых наиболее частыми были различные формы ишемической болезни сердца, гипертоническая болезнь, сахарный диабет, различной степени ожирение, кардиомиопатии, пиелонефрит и др. Прогрессирующая тяжесть клинических симптомов коррелировала с увеличением площади инфильтративных изменений легких, превышающих 70 %.

Для проведения морфологических исследований была сформирована основная группа, кото-

[5–8]. The development of various clinical symptomatology associated with cardiac insufficiency in COVID-19 is linked with the systemic damage to vascular bed and development of progressive microcirculatory disorders of the myocardium [9–12]. Obtaining new data on structural changes in endothelial cells of myocardial blood capillaries can form the basis for methodological approaches to studying the mechanisms of cardiac insufficiency development in COVID-19.

### AIM OF THE RESEARCH

Study of the structural changes in the myocardium and molecular biological characteristics of endothelium of blood capillaries in severe forms of COVID-19.

### MATERIALS AND METHODS

At the first stage of the study, the data on medical documents – inpatient records of 73 deceased patients with bilateral multisegmental viral pneumonia caused by the SARS-CoV-2 virus between September 2020 and July 2021 in the Novosibirsk City Infectious Clinical Hospital No. 1 were analyzed. In all observations, in patients was severe novel coronavirus infection (COVID-19). Infection with the SARS-CoV-2 virus was confirmed *intra vitam* using polymerase chain reaction (PCR). Patients received treatment in full compliance with the Temporary Clinical Guidelines for the Treatment of a Novel Coronavirus Infection (versions 9-11, November 2020 – July 2021).

Of those who died in the hospital, 56.16% were men (41 patients) and 43.4% (32 patients) were women. Among the deceased, 63.2% were under 65 years of age, and 36.8% were over 65 years of age. Most patients (79.45%, 58 people) had well-controlled comorbidities among which the most common were various forms of coronary heart disease, hypertension, diabetes mellitus, varying degrees of obesity, cardiomyopathy, pyelonephritis, etc. The progressive severity of clinical symptoms correlated with an increase in the area of infiltrative changes in the lungs, exceeding 70%.

To perform morphological study, the main group was formed, which consisted of 43 male and female cadavers aged from 39 to 68 years, the average age was  $53 \pm 5.45$  years. During autopsy myocardial fragments from the anterior, lateral, posterior walls of the left ventricle and the septum of the heart of deceased from COVID-19 were collected. The control group consisted of 15 deceased (sudden coronary death), delivered by ambulance, their average age was  $47 \pm 4.5$  years ( $p < 0.05$ ). Myocardial samples

рую составили 43 трупа мужского и женского пола в возрасте от 39 до 68 лет, средний возраст  $53 \pm 5.45$  года. На аутопсии осуществлялся забор фрагментов миокарда из области передней, боковой, задней стенок левого желудочка и перегородки сердца умерших от COVID-19. Группу контроля составили 15 скоропостижно умерших мужчин («острая коронарная смерть»), доставленных машиной скорой помощи, их средний возраст составил  $47 \pm 4.5$  года ( $p < 0.05$ ). Образцы миокарда из трех областей левого желудочка и перегородки были взяты на аутопсии в первые 12 ч после наступления смерти. Критериями включения в контрольную группу были возраст 43–55 лет и наличие на аутопсии начальных поражений венечных артерий атеросклерозом в стадии липоидоза и липосклероза.

При проведении работы с трупным материалом соблюдались требования и условия в соответствии с законодательством РФ и Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации. Исследование одобрено Комитетом по этике Новосибирского государственного медицинского университета (протокол № 138 от 21.10.2021).

Для световой и поляризационной микроскопии фрагменты фиксировали в 10% забуференном формалине, после чего проводили стандартную проводку материала в гистопроцессоре с последующим заключением в парафин. На ротационном микротоме изготавливали срезы толщиной около 5 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином. При помощи компьютерной программы Leica QWin (Leica, Германия) на световом уровне оценивали патоморфологические изменения в сердечной мышце при увеличении микроскопа  $\times 100$ ,  $\times 200$ ,  $\times 400$ . Для определения альтеративных изменений была выполнена микроскопия в поляризованном свете на микроскопе Leica DM 4000B (Leica, Германия), который был оснащен анализатором и поляризатором. Для селективного выявления фибрина срезы миокарда окрашивали по методике оранжевый-красный-голубой Д.Д. Зербино [13].

Для иммуногистохимического (ИГХ) исследования парафиновые срезы толщиной 4–5 мкм депарафинизировали в ксилоле и этиловом спирте, производили демаскировку антигенов тканей в цитратном буфере. ИГХ-окрашивание выполняли согласно рекомендациям, изложенным в руководствах по иммуногистохимическим исследованиям и инструкциям фирм-производителей. Использовали антитела: monoclonal

from three regions of the left ventricle and septum were taken during autopsy in the first 12 hours after death. The inclusion criteria for the control group were: age 43–55 years and the presence of initial atherosclerotic lesions of the coronary arteries in the form of lipoidosis and liposclerosis on autopsy.

When working with autopsied specimens, the requirements and conditions of the legislation of the Russian Federation and the Declaration of Helsinki of the World Medical Association were observed. The study was approved by the Ethics Committee of the Novosibirsk State Medical University (protocol No. 138 dated 21.10.2021).

For light and polarization microscopy, the samples were fixed in 10% buffered formalin, following that standard processing in a histoprocessor with subsequent embedding in paraffin was conducted. Sections of 5  $\mu\text{m}$  thickness were made on a rotary microtome and stained with hematoxylin and eosin. Using the Leica QWin computer program (Leica, Germany), pathomorphological changes in the heart muscle were assessed by light microscopy at magnification  $\times 100$ ,  $\times 200$ ,  $\times 400$ . To determine alterative changes, polarized light microscopy was applied using a Leica DM 4000B microscope (Leica, Germany), equipped with an analyzer and a polarizer. For selective detection of fibrin, myocardial sections were stained using Martius, scarlet, blue (MSB) method according to D.D. Zerbino [13].

For immunohistochemical (IHC) study, 4–5  $\mu\text{m}$  paraffin sections were deparaffinized in xylene and ethyl alcohol, and tissue antigen retrieval was performed in citrate buffer. IHC staining was performed according to the recommendations of immunohistochemical study guidelines and the manufacturers' manuals. The following antibodies were used: monoclonal mouse antibody CD31 endothelial cell (clone JC70, Cell Marque, USA), monoclonal mouse antibody CD34 endothelial cell (clone QBEnd/10, Cell Marque, USA). CD31 and CD34 expression was assessed quantitatively by counting the volume density of positively stained vascular cells at magnification  $\times 400$  using an open test system in 15 fields of view of each preparation. Morphometric assessment was performed using the ImageJ program (Wayne Rasband, USA).

Statistical processing was carried out using licensed Microsoft Office Excel 2010 software (Microsoft, USA) and STATISTICA v. 6 (StatSoft Inc., USA). The results in tables and diagrams for quantitative values of structural and immunohistochemical parameters are presented as the arithmetic mean (M) and standard deviation (SD), for qualitative parameters – as values and percentages. The fig-

mouse antibody CD31 endothelial cell (клон JC70, Cell Marque, США), monoclonal mouse antibody CD34 endothelial cell (клон QVEnd/10, Cell Marque, США). Экспрессию CD31 и CD34 оценивали количественно путем подсчета объемной плотности позитивных клеток сосудов при увеличении  $\times 400$  с использованием открытой тестовой системы в 15 полях зрения каждого препарата. Морфометрическая оценка проводилась с помощью компьютерной программы ImageJ (Wayne Rasband, США).

Статистическая обработка была проведена с использованием лицензированного пакета программ Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft, США) и STATISTICA v. 6 (StatSoft Inc., США). Результаты в таблицах и диаграммах для количественных величин структурных и иммуногистохимических показателей представлены в виде средней арифметической величины (M) и стандартного отклонения (SD), для качественных величин – как значения и проценты. Показатели исследования проверялись на нормальность распределения с помощью критерия Колмогорова – Смирнова. Межгрупповые различия оценивали, используя *U*-критерий Манна – Уитни, при уровне достоверной вероятности 95 % ( $p < 0.05$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При оценке данных карт стационарного больного у пациентов с тяжелыми формами COVID-19 отмечали обширное поражение легких, превышающее во всех наблюдениях 70 % суммарной площади органов. У всех пациентов было статистически значимое повышение С-реактивного протеина, показатель которого возрастал более чем в 100 раз относительно референсных значений (табл. 1). По мере прогрессирования COVID-19 с повторными цитокиновыми атаками возрастал в несколько раз D-димер, как информативный критерий повреждения эндотелия у пациентов с тяжелыми формами новой коронавирусной инфекции. Было отмечено возрастание более чем в 3 раза тропонина I, что свидетельствовало об остром повреждении миокарда. Информативным показателем снижения сократительной способности миокарда левого желудочка явились данные эхокардиографического исследования, при котором отмечали снижение фракции выброса левого желудочка на 32 %. По данным ЭКГ-контроля функциональной деятельности сердца у всех пациентов отмечали нарушение реполяризации. Более чем в 70 % слу-

ures obtained were checked for normal distribution using the Kolmogorov-Smirnov test. Differences between groups were assessed using the Mann-Whitney *U*-test at a 95% confidence level ( $p < 0.05$ ).

## RESULTS AND DISCUSSION

When evaluating the inpatient records of individuals with severe COVID-19, extensive lung damage was noted, exceeding 70% of the total organ area in all cases. All patients had a statistically significant increase in the C-reactive protein level which was higher more than 100 times relative to the reference values (Table 1). As COVID-19 progressed with repeated cytokine storms, D-dimer increased several times as an informative criterion for endothelial damage in patients with severe COVID-19. An increase in troponin I by more than 3 times was registered, which indicated acute myocardial damage. An informative marker of a decrease in left ventricular myocardial contractility were echocardiographic (ECG) findings, namely a decrease in left ventricular ejection fraction by 32%. According to the ECG monitoring data, all patients showed impaired repolarization. In more than 70% of cases, various arrhythmic disorders were observed on the ECG, among which atrial fibrillation was predominant. In every third case, persistent resistant arterial hypotension was observed with average blood pressure values less than 50 mm Hg, despite the use of vasopressors, which was associated with a decrease in myocardial contractility and peripheral vascular resistance.

Light microscopy has revealed that the development of severe COVID-19 in patients with fatal outcome was accompanied by acute impairment of blood circulation. Paresis and congestion of veins, spasm of intramural coronary arteries with vertical extension of endothelial cells into the vessel lumen, stasis of erythrocytes, in some places, with a phenomenon of sludge (Fig. 1, A, B), were observed. Endothelial cells of blood capillaries were extremely swollen (Fig. 1, C). The presence of diapedetic and focal hemorrhages was noted, formation of which was associated with impaired vascular permeability. Leukostasis in the lumen of vessels, occasionally leukocyte margination and their migration outside the vascular bed were found. The appearance of fibrin masses in the lumen of vessels was observed, which was due to the process of intravascular thrombus formation. Fibrin clots were stained in various colors – Martius yellow, scarlet, blue and their shades, which made it possible to judge the age of thrombi formation [13].

The described pathohistological changes were accompanied by myocardial ischemia (Fig. 1, D) and

**Таблица 1.** Характеристика клинико-функциональных и лабораторных показателей у пациентов с тяжелой формой COVID-19**Table 1.** Clinical, functional and laboratory parameters in patients with severe COVID-19

| Показатель<br>Parameter  | Нормальные значения<br>Reference values | Тяжелые формы COVID-19<br>Severe COVID-19 |
|--|---|---|
| С-реактивный протеин (мг/л)<br>C-reactive protein (mg/l)                       | 0–5                                     | 137.03*                                   |
| Тропонин I (нг/мл) / Troponin I (ng/ml)  | 0–1                                     | 3.7*                                      |
| D-димер (нг/мл) / D-dimer (ng/ml)  | 250                                     | 420*                                      |
| Поражение легких (%) / Lung damage area (%)                                    | –                                       | 73.1*                                     |
| Фракция выброса левого желудочка (%)<br>Left ventricular ejection fraction (%) | 55–70                                   | 43.5*                                     |

\* $p < 0.05$  при сравнении с нормальными значениями. $p < 0.05$  in comparison with the reference values.

чаев на ЭКГ наблюдали различные аритмические нарушения, среди которых превалировала фибрилляция предсердий. В каждом третьем случае наблюдали стойкую резистентную артериальную гипотонию, при которой средние показатели АД были менее 50 мм рт. ст., несмотря на использование вазопрессорных препаратов, что было связано со снижением сократительной способности миокарда и периферического сосудистого сопротивления.

При световой микроскопии было отмечено, что развитие тяжелых форм новой коронавирусной инфекции (COVID-19) у пациентов с летальным исходом сопровождалось острыми нарушениями кровообращения. Наблюдали парез и полнокровие вен, спазм интрамуральных артерий с вертикальным вытягиванием эндотелиоцитов в просвет сосуда, стазы эритроцитов, местами с явлением сладж-феномена (рис. 1, А, В). Эндотелиальные клетки кровеносных капилляров были резко набухшими (рис. 1, С). Отмечали наличие диапедезных и очаговых кровоизлияний, образование которых было связано с нарушением проницаемости сосудистой стенки. В просвете сосудов были обнаружены лейкостазы, местами краевое стояние лейкоцитов и их миграция за пределы сосудистого русла. Наблюдали появление в просвете сосудов фибриновых масс, что было обусловлено процессом внутрисосудистого тромбообразования. Фибриновые тромбы были окрашены в различные цвета – оранжевый, красный, фиолетовый и их оттенки, что позволяло судить о давности образования тромбов [13].

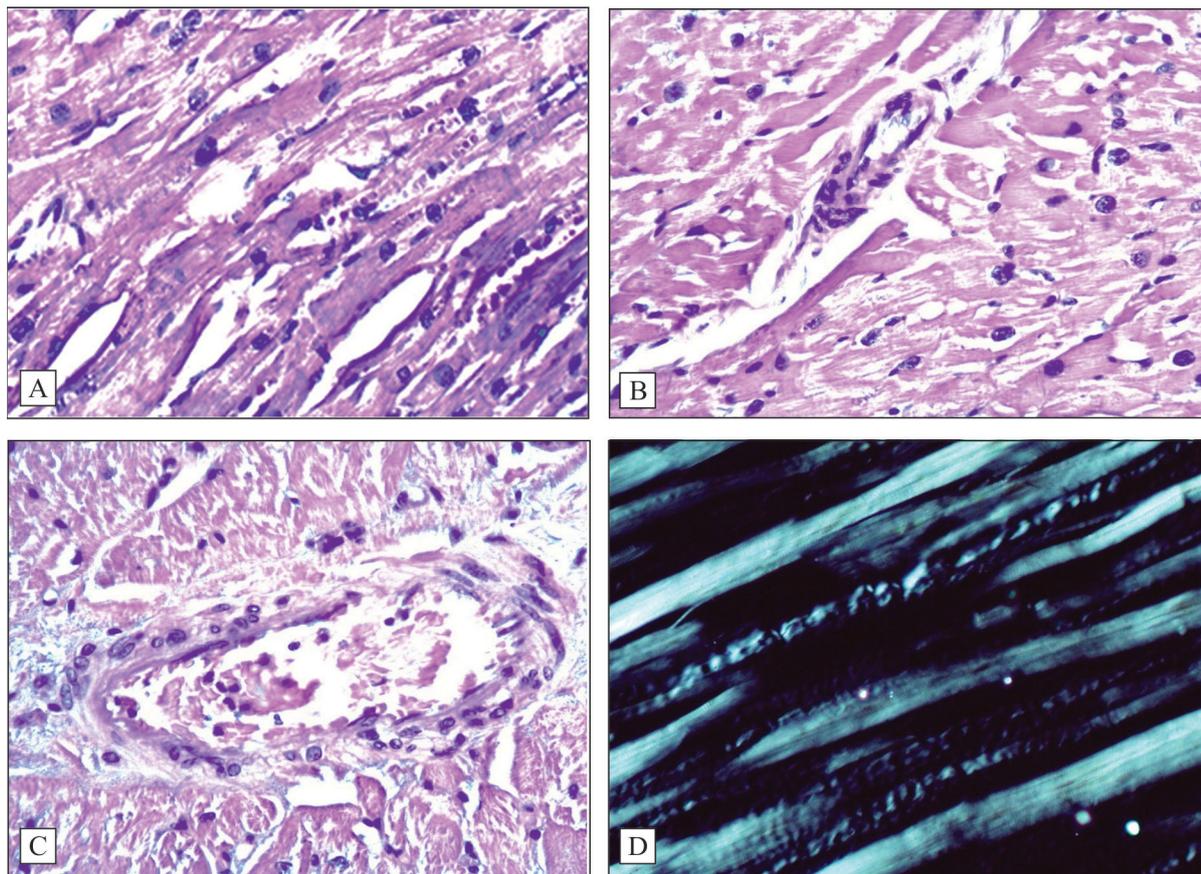
Описанные патогистологические изменения сопровождалась ишемией мышцы сердца (рис. 1, D) и образованием острых очаговых повреждений миокарда, выявляемых при поля-

the formation of acute focal myocardial damage detected by polarization microscopy. In patients who died from severe COVID-19, multiple segmental cardiomyocyte contractures, as well as contractures of grades I, II and III, were recorded in the myocardium. At least 2–3 contractures in one field of view were observed, which were most often detected in the subendocardial layers of the myocardium of the left ventricle. Along with contractures, single cardiomyocytes or small groups of cells with myocytolysis or primary granulation were visible. In addition, lipofuscinosis in the form of small lipid inclusions in individual groups of cardiomyocytes was detected. Lipofuscinosis, as well as all the abovementioned pathomorphological changes, were present in all cases of COVID-19 and were associated with degenerative changes of the myocardium.

The revealed features of endothelial damage in COVID-19 correlated with the data of IHC which was carried out to determine the expression level of the blood vessel markers – CD31 (PECAM-1) and CD34 proteins. Endothelial cells of myocardial blood vessel in severe COVID-19 were characterized by a pronounced decrease in the level of the blood vessel markers expression – CD31 (PECAM-1) and CD34 proteins (Table 2).

The results obtained are consistent with the literature data that the inflammatory response in COVID-19 is an important factor in the development of severe microcirculatory disorders, accompanied by endothelial cell alteration, endothelial-mesenchymal transition, endothelial dysfunction and endothelial destruction, with the presence of detectable circulating endothelial cells [13–15].

Thus, the analysis of clinical and laboratory data showed that a decrease in myocardial contractility in severe forms of COVID-19 is associated with an increase in the level of C-reactive protein, D-dimer,



**Рис. 1.** Морфология миокарда у пациентов с COVID-19: А – агрегация, сгущивание эритроцитов в капиллярах, отек стромы миокарда. Увеличение (ув.)  $\times 200$ . Окраска гематоксилином и эозином; В – эндотелиоциты спазмированной артерии в виде частокла, отек стенки сосуда, десквамация эндотелия, метахромазия и продольное расщепление кардиомиоцитов, отек стромы. Ув.  $\times 100$ . Окраска гематоксилином и эозином; С – отек стенки артерии, набухание эндотелия, эндотелиоциты в виде частокла, в просвете – клетки белой крови, фибриновые массы. Ув.  $\times 400$ . Окраска гематоксилином и эозином; D – контрактуры III степени и глыбчатый распад кардиомиоцитов. Ув.  $\times 200$ . Поляризационная микроскопия

**Fig. 1.** Myocardial morphology in patients with COVID-19: A – aggregation, sludge formation of erythrocytes in capillaries, edema of the myocardial stroma. Magnification  $\times 200$ . Hematoxylin and eosin staining; B – endothelial cells of the stenotic artery in the form of a picket fence, edema of the vessel wall, endothelial desquamation, metachromasia and longitudinal splitting of cardiomyocytes, stromal edema. Magnification  $\times 100$ . Hematoxylin and eosin staining; C – edema of the artery wall, swelling of the endothelium, endothelial cells in the form of a picket fence, in the lumen – white blood cells, fibrin masses. Magnification  $\times 400$ . Hematoxylin and eosin staining; D – grade III contractures and granularity of cardiomyocytes. Magnification  $\times 200$ . Polarization microscopy

ризацонной микроскопии. У пациентов, умерших от тяжелых форм COVID-19, было отмечено наличие в миокарде множественных сегментарных контрактур кардиомиоцитов, а также контрактур I, II и III степени. Наблюдали не менее 2–3 контрактур в одном поле зрения, которые чаще выявляли в субэндокардиальных слоях миокарда левого желудочка сердца. Наряду с контрактурами, просматривались единичные кардиомиоциты или небольшие группы клеток с миоцитоллизисом или первичным глыбчатым распадом. Кроме того, был выявлен липофусциноз в виде мелких жировых включений в отдель-

тропонин I, which indicated acute myocardial damage. An informative indicator of the decrease in contractility of the left ventricular myocardium were the echocardiography and ECG monitoring data.

In addition, in severe forms of COVID-19, structural changes in the myocardium were characterized by acute circulatory disorders, focal hemorrhages, edema, desquamation and proliferation of the endothelium of blood vessels, as well as the formation of acute focal myocardial damage and lipofuscinosis of cardiomyocytes, which is associated with endothelial dysfunction and is accompanied by a decrease in the left ventricular myocardial contractility. In severe

**Таблица 2.** Иммуногистохимическое исследование: объемная плотность (Vv, %) CD31 и CD34 кровеносных сосудов миокарда у пациентов с COVID-19 и в группе контроля (M ± SD)**Table 2.** Immunohistochemical study: volume density (Vv, %) of CD31 and CD34 in myocardial blood vessels in patients with COVID-19 and in the control group (M ± SD)

| Показатель / Parameter | Контрольная группа / Control group | Основная группа / Main group |
|------------------------|------------------------------------|------------------------------|
| CD31                   | 4.11 ± 1.59                        | 1.69 ± 1.33*                 |
| CD34                   | 6.12 ± 1.78                        | 2.35 ± 2.00*                 |

\* $p < 0.0005$  при сравнении с контрольной группой.  
 $p < 0.0005$  in comparison with the control group.

ных группах кардиомиоцитов. Липофусциноз, так же как и все вышеуказанные патоморфологические изменения, был представлен во всех наблюдениях COVID-19 и был связан с дистрофическими изменениями миокарда.

Выявленные особенности поражения эндотелия при COVID-19 коррелировали с данными, полученными при проведении ИГХ-исследования, которое проводилось с целью определения уровня экспрессии белков – маркеров кровеносных сосудов CD31 (PECAM-1) и CD34. Эндотелиоциты кровеносных сосудов миокарда при тяжелом течении COVID-19 характеризовались выраженным снижением уровня экспрессии белков – маркеров кровеносных сосудов CD31 (PECAM-1) и CD34 (табл. 2).

Полученные результаты согласуются с данными литературы о том, что воспалительная реакция при COVID-19 является важным фактором развития выраженных микроциркуляторных расстройств, сопровождающихся альтерацией эндотелиоцитов, эндотелиально-мезенхимальным переходом, эндотелиальной дисфункцией и эндотелиальной деструкцией, с наличием выявляемых циркулирующих эндотелиальных клеток [13–15].

Таким образом, анализ клинико-лабораторных данных показал, что снижение сократительной способности миокарда при тяжелых формах COVID-19 связано с повышением уровня С-реактивного протеина, D-димера, тропонина I, что свидетельствовало об остром повреждении миокарда. Информативным показателем снижения сократительной способности миокарда левого желудочка явились данные эхокардиографического исследования и ЭКГ-контроля.

Кроме того, при тяжелых формах COVID-19 структурные изменения миокарда характеризовались острыми расстройствами кровообращения, очаговыми кровоизлияниями, отеком, десквамацией и пролиферацией эндотелия кровеносных сосудов, также образованием

формы COVID-19, changes in the molecular characteristics of the endothelium of myocardial blood capillaries – a decrease in the expression of CD31 (by 2.4 times,  $p < 0.0005$ ) and CD34 (by 2.6 times,  $p < 0.0005$ ), which reflects the developing impairments in the intercellular interaction of endothelial cells and is associated with progressive endothelial dysfunction in a novel coronavirus infection.

## CONCLUSION

The obtained data on degenerative changes in the myocardium and the structure of endothelial cells of blood capillaries are a morphological substantiation for cardiac symptomatology in severe forms of COVID-19 and can be used as a basis for methodological approaches to studying mechanisms of development of heart failure in a novel coronavirus infection.

**Financing.** The research was carried out within the framework of the state assignment No. NFWNR-2022-0012 of the Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

острых очаговых повреждений миокарда и липофусцинозом кардиомиоцитов, что связано с эндотелиальной дисфункцией и сопровождается снижением сократительной способности мышцы левого желудочка сердца. При тяжелых формах COVID-19 были выявлены изменения молекулярных характеристик эндотелия кровеносных капилляров миокарда в виде снижения экспрессии маркеров CD31 (в 2.4 раза,  $p < 0.0005$ ) и CD34 (в 2.6 раза,

$p < 0.0005$ ), что отражает развивающиеся нарушения межклеточного взаимодействия эндотелиоцитов и связано с прогрессирующей при новой коронавирусной инфекции дисфункции эндотелия.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные о дистрофических изменениях миокарда и структуры эндотелиоцитов кровеносных капилляров являются морфологическим обоснованием кардиальной симптоматики при тяжелых формах COVID-19 и могут быть положены в основу методических подходов для изучения механизмов развития сердечной

недостаточности при новой коронавирусной инфекции.

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания № NFWNR-2022-0012 Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии – филиала ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Guo T., Fan Y., Chen M. et al. Cardiovascular implications of fatal outcomes of patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19) // *JAMA Cardiol.* 2020;5(7):811-818. DOI: 10.1001/jamacardio.2020.1017.
2. Italia L., Tomasoni D., Bisegna S. et al. COVID-19 and heart failure: from epidemiology during the pandemic to myocardial injury, myocarditis, and heart failure sequelae // *Front. Cardiovasc. Med.* 2021;8:713560. DOI: 10.3389/fcvm.2021.713560.
3. Liu P.P., Blet A., Smyth D., Li H. The science underlying COVID-19: implications for the cardiovascular system // *Circulation.* 2020;142(1):68-78. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.120.047549.
4. Shi S., Qin M., Shen B. et al. Association of cardiac injury with mortality in hospitalized patients with COVID-19 in Wuhan, China // *JAMA Cardiol.* 2020;5(7):802-810. DOI: 10.1001/jamacardio.2020.0950.
5. Рыбакова М.Г., Карев В.Е., Кузнецова И.А. Патологическая анатомия новой коронавирусной инфекции COVID-19. Первые впечатления // *Архив патологии.* 2020;82(5):5-15. DOI: 10.17116/patol12020820515.
6. Arévalos V., Ortega-Paz L., Rodríguez-Arias J.J. et al. Myocardial injury in COVID-19 patients: association with inflammation, coagulopathy and in-hospital prognosis // *J. Clin. Med.* 2021;10(10):2096. DOI: 10.3390/jcm10102096.
7. Basso C., Leone O., Rizzo S. et al. Pathological features of COVID-19-associated myocardial injury: a multi-centre cardiovascular pathology study // *Eur. Heart J.* 2020;41(39):3827-3835. DOI: 10.1093/eurheartj/ehaa66431.
8. Roquetaillade C., Chousterman B.G., Tomasoni D. et al. Unusual arterial thrombotic events in Covid-19 patients // *Int. J. Cardiol.* 2021;323:281-284. DOI: 10.1016/j.ijcard.2020.08.103.
9. Ackermann M., Verleden S.E., Kuehnel M. et al. Pulmonary vascular endothelialitis, thrombosis, and angiogenesis in Covid-19 // *N. Engl. J. Med.* 2020;383(2):120-128. DOI: 10.1056/NEJMoa2015432.
10. Goshua G., Pine A.B., Meizlish M.L. et al. Endotheliopathy in COVID-19-associated coagulopathy: evidence from a single-centre, cross-sectional study // *Lancet*

## REFERENCES

1. Guo T., Fan Y., Chen M. et al. Cardiovascular implications of fatal outcomes of patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19). *JAMA Cardiol.* 2020;5(7):811-818. DOI: 10.1001/jamacardio.2020.1017.
2. Italia L., Tomasoni D., Bisegna S. et al. COVID-19 and heart failure: from epidemiology during the pandemic to myocardial injury, myocarditis, and heart failure sequelae. *Front. Cardiovasc. Med.* 2021;8:713560. DOI: 10.3389/fcvm.2021.713560.
3. Liu P.P., Blet A., Smyth D., Li H. The science underlying COVID-19: implications for the cardiovascular system. *Circulation.* 2020;142(1):68-78. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.120.047549.
4. Shi S., Qin M., Shen B. et al. Association of cardiac injury with mortality in hospitalized patients with COVID-19 in Wuhan, China. *JAMA Cardiol.* 2020;5(7):802-810. DOI: 10.1001/jamacardio.2020.0950.
5. Rybakova M.G., Karev V.E., Kuznetsova I.A. Anatomical pathology of novel coronavirus (COVID-19) infection. First impressions. *Archive of Pathology.* 2020;82(5):5-15. DOI: 10.17116/patol12020820515. (In Russ.)
6. Arévalos V., Ortega-Paz L., Rodríguez-Arias J.J. et al. Myocardial injury in COVID-19 patients: association with inflammation, coagulopathy and in-hospital prognosis. *J. Clin. Med.* 2021;10(10):2096. DOI: 10.3390/jcm10102096.
7. Basso C., Leone O., Rizzo S. et al. Pathological features of COVID-19-associated myocardial injury: a multi-centre cardiovascular pathology study. *Eur. Heart J.* 2020; 41(39):3827-3835. DOI: 10.1093/eurheartj/ehaa66431.
8. Roquetaillade C., Chousterman B.G., Tomasoni D. et al. Unusual arterial thrombotic events in Covid-19 patients. *Int. J. Cardiol.* 2021;323:281-284. DOI: 10.1016/j.ijcard.2020.08.103.
9. Ackermann M., Verleden S.E., Kuehnel M. et al. Pulmonary vascular endothelialitis, thrombosis, and angiogenesis in Covid-19. *N. Engl. J. Med.* 2020;383(2):120-128. DOI: 10.1056/NEJMoa2015432.
10. Goshua G., Pine A.B., Meizlish M.L. et al. Endotheliopathy in COVID-19-associated coagulopathy: evidence from a single-centre, cross-sectional study. *Lan-*

- Haematol. 2020;7(8):e575-e582. DOI: 10.1016/S2352-3026(20)30216-7.
11. Iba T., Connors J.M., Levy J.H. The coagulopathy, endotheliopathy, and vasculitis of COVID-19 // *Inflamm. Res.* 2020;69(12):1181-1189. DOI: 10.1007/s00011-020-01401-6.
  12. Xu S.W., Ilyas I., Weng J.P. Endothelial dysfunction in COVID-19: an overview of evidence, biomarkers, mechanisms and potential therapies // *Acta Pharmacol. Sin.* 2023;44(4):695-709. DOI: 10.1038/s41401-022-00998-0.
  13. Саенко А.В. Оценка состояния фибрина для определения давности механической травмы // Актуальные вопросы теории и практики судебной медицины. М., 1998. С. 71–72.
  14. Guervilly C., Burtey S., Sabatier F. et al. Circulating endothelial cells as a marker of endothelial injury in severe COVID-19 // *J. Infect. Dis.* 2020;222(11):1789-1793. DOI: 10.1093/infdis/jiaa528.
  15. Mancuso P., Gidaro A., Gregato G. et al. Circulating endothelial progenitors are increased in COVID-19 patients and correlate with SARS-CoV-2 RNA in severe cases // *J. Thromb. Haemost.* 2020;18(10):2744-2750. DOI: 10.1111/jth.15044.
- et Haematol.* 2020;7(8):e575-e582. DOI: 10.1016/S2352-3026(20)30216-7.  
 11. Iba T., Connors J.M., Levy J.H. The coagulopathy, endotheliopathy, and vasculitis of COVID-19. *Inflamm. Res.* 2020;69(12):1181-1189. DOI: 10.1007/s00011-020-01401-6.  
 12. Xu S.W., Ilyas I., Weng J.P. Endothelial dysfunction in COVID-19: an overview of evidence, biomarkers, mechanisms and potential therapies. *Acta Pharmacol. Sin.* 2023;44(4):695-709. DOI: 10.1038/s41401-022-00998-0.  
 13. Saenko A.V. (1998). Assessment of fibrin to determine the duration of mechanical injury. In *Current Issues in the Theory and Practice of Forensic Medicine*. Moscow. P. 71–72. (In Russ.)  
 14. Guervilly C., Burtey S., Sabatier F. et al. Circulating endothelial cells as a marker of endothelial injury in severe COVID-19. *J. Infect. Dis.* 2020;222(11):1789-1793. DOI: 10.1093/infdis/jiaa528.  
 15. Mancuso P., Gidaro A., Gregato G. et al. Circulating endothelial progenitors are increased in COVID-19 patients and correlate with SARS-CoV-2 RNA in severe cases. *J. Thromb. Haemost.* 2020;18(10):2744-2750. DOI: 10.1111/jth.15044.

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

**Савченко Сергей Владимирович** – врач – судебно-медицинский эксперт и патологоанатом, д-р мед. наук, профессор кафедры судебной медицины ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0002-8525-5883.

**Ламанов Алексей Николаевич** – врач – судебно-медицинский эксперт и патологоанатом, ассистент кафедры патологической анатомии ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0002-3495-1491.

**Айзикович Борис Исаевич** – д-р мед. наук, профессор кафедры фундаментальной медицины ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный медицинский университет», Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0003-2724-6273.

**Грицингер Валентина Александровна** – врач – судебно-медицинский эксперт, канд. мед. наук, старший преподаватель кафедры судебной медицины ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0003-4119-3569.

**Бгатова Наталия Петровна** – д-р биологических наук, профессор, заведующий лабораторией ультраструктурных исследований Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии – филиала ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0002-4507-093X.

**Таскаева Юлия Сергеевна** – канд. мед. наук, старший научный сотрудник лаборатории ультра-

## ABOUT THE AUTHORS

**Sergey V. Savchenko** – Forensic Physician and Pathologist, Dr. Sci. (Med.), Professor, Department of Forensic Medicine, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0002-8525-5883.

**Alexey N. Lamanov** – Forensic Physician and Pathologist, Assistant, Department of Forensic Medicine, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0002-3495-1491.

**Boris I. Aizikovich** – Dr. Sci. (Med.), Professor, Department of Fundamental Medicine, Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0003-2724-6273.

**Valentina A. Gritsinger** – Forensic Physician and Pathologist, Cand. Sci. (Med.), Senior Lecturer, Department of Forensic Medicine, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0003-4119-3569.

**Natalia P. Bgatova** – Dr. Sci. (Bio.), Professor, Head, Laboratory of Ultrastructural Research, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0002-4507-093X.

**Yulia S. Taskaeva** – Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, Laboratory of Ultrastructural Research, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0002-2812-2574.

**Larisa L. Pozdnyakova** – Cand. Sci. (Med.), Chief Physician, City Infectious Clinical Hospital No. 1, Novosibirsk, Russia.

траструктурных исследований Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии – филиала ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0002-2812-2574.

**Позднякова Лариса Леонидовна** – канд. мед. наук, главный врач ГБУЗ НСО «Городская инфекционная клиническая больница № 1», Новосибирск, Россия.

**Шишкова Ольга Михайловна** – канд. мед. наук, заведующий патологоанатомическим отделением ГБУЗ НСО «Городская инфекционная клиническая больница № 1», Новосибирск, Россия.

**Ульянова Яна Сергеевна** – канд. мед. наук, заместитель главного врача по медицинской части ГБУЗ НСО «Городская инфекционная клиническая больница № 1», Новосибирск, Россия.

**Филина Елена Ивановна** – канд. мед. наук, заведующий диагностическим отделением ГБУЗ НСО «Городская инфекционная клиническая больница № 1», Новосибирск, Россия.

**Olga M. Shishkova** – Cand. Sci. (Med.), Head, Pathological Anatomy Department, City Infectious Clinical Hospital No. 1, Novosibirsk, Russia.

**Yana S. Ulyanova** – Cand. Sci. (Med.), Deputy Chief Physician for Medical Affairs, City Infectious Clinical Hospital No. 1, Novosibirsk, Russia.

**Elena I. Filina** – Cand. Sci. (Med.), Head, Diagnostic Department, City Infectious Clinical Hospital No. 1, Novosibirsk, Russia.



## Морфофункциональное состояние эндокринного аппарата семенников крыс после перенесенной противоопухолевой химиотерапии

Э.Э. Абрамкин<sup>1</sup>, И.Ю. Макаров<sup>1</sup>, Н.В. Меньщикова<sup>1</sup>, А.А. Абрамкина<sup>1</sup>, А.П. Надеев<sup>2</sup>,  
А.Б. Логинова<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Амурская государственная медицинская академия» Минздрава России, Благовещенск, Россия

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия

<sup>3</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России, Москва, Россия

### АННОТАЦИЯ

**В в е д е н и е .** Улучшение качества диагностики и раннее начало лечения злокачественных новообразований привело к уменьшению показателя смертности от них. Однако токсичность, связанная с применением химиотерапии, способна вызвать поздние и долгосрочные побочные эффекты, одним из которых является бесплодие. На данный момент недостаточно изучены механизмы повреждения, вызванные токсическим действием препаратов, предназначенных для лечения гемобластозов.

**Ц е л ь .** Изучить морфофункциональное состояние эндокринного аппарата семенников крыс после введения химиопрепаратов.

**М а т е р и а л ы и м е т о д ы .** Проведено исследование по типу «случай-контроль» на 50 крысах линии Wistar в возрасте 3 мес массой 270–300 г. Группу контроля ( $n = 10$ ) составили крысы, не получавшие препараты для лечения гемобластозов, опытную группу ( $n = 40$ ) – крысы, которым внутривентриально вводили циклофосфамид, гидроксиданурубицин, онковинкристин, преднизолон (схема СНОР). Всем крысам определяли уровень тестостерона и лютеинизирующего гормона на иммуноферментном анализаторе. Измеряли массу и рассчитывали массовый индекс семенников крыс, проводили морфометрию клеток Лейдига.

**Р е з у л ь т а т ы .** После двукратного введения препаратов группы СНОР на 14-е сутки у крыс опытной группы отмечалось снижение массы и массового индекса семенников. Результаты морфометрии свидетельствовали об уменьшении количества эндокриноцитов, количества клеток Лейдига средних и больших размеров и увеличении количества малых форм этих клеток. Концентрация тестостерона в плазме крови снижалась. К 35-м суткам исследованные показатели у крыс опытной группы соответствовали контролю.

**З а к л ю ч е н и е .** Двукратное применение противоопухолевых препаратов комплекса СНОР (7-е и 14-е сутки) у крыс сопровождалось снижением массы семенников, дистрофическими и атрофическими изменениями в интерстициальных островках, клетках Лейдига, уменьшением концентрации тестостерона в плазме крови. К 35-м суткам эксперимента развивались компенсаторно-приспособительные реакции, характеризующиеся восстановлением массы семенников, увеличением средних и больших форм эндокриноцитов и уровня тестостерона в плазме крови.

**Ключевые слова:** эндокриноциты, клетки Лейдига, химиотерапия, СНОР, морфометрия, крысы.

**Образец цитирования:** Абрамкин Э.Э., Макаров И.Ю., Меньщикова Н.В., Абрамкина А.А., Надеев А.П., Логинова А.Б. Морфофункциональное состояние эндокринного аппарата семенников крыс после перенесенной противоопухолевой химиотерапии // Journal of Siberian Medical Sciences. 2024;8(3):102-114. DOI: 10.31549/2542-1174-2024-8-3-102-114

Поступила в редакцию 09.07.2024  
Прошла рецензирование 19.07.2024  
Принята к публикации 10.08.2024

Автор, ответственный за переписку  
Надеев Александр Петрович: ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России. 630091, г. Новосибирск, Красный просп., 52.  
E-mail: nadeevngma@mail.ru

Received 09.07.2024  
Revised 19.07.2024  
Accepted 10.08.2024

Corresponding author  
Alexander P. Nadeev: Novosibirsk State Medical University, 52, Krasny prosp., Novosibirsk, 630091, Russia.  
E-mail: nadeevngma@mail.ru

## Morphofunctional state of the endocrine apparatus of rat testicles after anti-tumor chemotherapy

E.E. Abramkin<sup>1</sup>, I.Yu. Makarov<sup>1</sup>, N.V. Menshchikova<sup>1</sup>, A.A. Abramkina<sup>1</sup>, A.P. Nadeev<sup>2</sup>, A.B. Loginova<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Amur State Medical Academy, Blagoveshchensk, Russia

<sup>2</sup>Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia

<sup>3</sup>National Medical Research Center for Hematology, Moscow, Russia

### ABSTRACT

**I n t r o d u c t i o n .** Improvements in the quality of diagnosis and early treatment of malignant neoplasms have led to a decrease in the mortality rate. However, chemotherapy-induced toxicity can cause late and long-term side effects, one of which is infertility. At the moment, the mechanisms of damage caused by the toxic effect of drugs designated for the treatment of hematologic malignancies have not been sufficiently studied.

**A i m .** To study the morphofunctional state of the endocrine apparatus of rat testicles after the administration of chemotherapeutic agents.

**M a t e r i a l s a n d m e t h o d s .** A case-control study on 50 Wistar rats aged 3 months weighing 270–300 g was performed. The control group ( $n = 10$ ) consisted of rats which did not receive drugs for the treatment of hematologic malignancies, the experimental group ( $n = 40$ ) comprised rats which were intraperitoneally administered cyclophosphamide, hydroxydaunorubicin, vincristine, prednisolone (CHOP regimen). Testosterone and luteinizing hormone levels in rats were measured by enzyme immunoassay. The weight of rat testicles was measured, and the testicular mass index was calculated, as well as morphometry of Leydig cells was performed.

**R e s u l t s .** After a twofold administration of chemotherapeutic drugs (CHOP regimen), on the 14th day, the rats of the experimental group showed a decrease in the weight and mass index of the testicles. Results of morphometry indicated a decrease in the number of endocrine cells, number of medium- and large-size Leydig cells, and an increase in the number of small forms of these cells. Concentration of testosterone in blood plasma decreased. By the 35th day, the studied parameters in the rats of the experimental group corresponded to the controls.

**C o n c l u s i o n .** A twofold administration of chemotherapeutic drugs (CHOP regimen) on 7th and 14th days in rats was accompanied by a decrease in testicular weight, degenerative and atrophic changes in islets of interstitial (Leydig) cells, and a decrease in testosterone concentration in blood plasma. By the 35th day of the experiment, compensatory and adaptive responses were developing, characterized by the restoration of testicular weight, an increase in the number of medium- and large-size endocrine cells and testosterone level in blood plasma.

**Keywords:** endocrine cells, Leydig cells, chemotherapy, CHOP, morphometry, rats.

**Citation example:** Abramkin E.E., Makarov I.Yu., Menshchikova N.V., Abramkina A.A., Nadeev A.P., Loginova A.B. Morphofunctional state of the endocrine apparatus of rat testicles after anti-tumor chemotherapy. *Journal of Siberian Medical Sciences*. 2024;8(3):102-114. DOI: 10.31549/2542-1174-2024-8-3-102-114

### ВВЕДЕНИЕ

За последние годы отмечается увеличение частоты заболеваемости злокачественными новообразованиями. В возрасте до 30 лет наиболее часто встречаются гемобластозы – 32.8% [1–3]. Современные противоопухолевые препараты, применяемые для лечения гемобластозов, отличаются высокой степенью агрессивности, так как оказывают воздействие не только на атипичные клетки, но и на нормальные ткани и клетки. Токсичность, связанная с применением химиотерапии, способна вызвать ранние, поздние и долгосрочные побочные

### INTRODUCTION

In recent years, there has been an increase in the incidence of malignant neoplasms. In people under 30 years of age, hematologic malignancies are most common – 32.8% [1–3]. Modern anti-tumor drugs for the treatment of hematologic malignancies are highly aggressive, as they affect not only atypical cells, but also normal tissues and cells. The chemotherapy-related toxicity can cause early, late and long-term side effects [4]. Diseases and pathological conditions caused by the use of cytostatic drugs, as a rule, develop in a long-term period and are characterized by a chronic course [5]. Frequent manifesta-

эффекты [4]. Заболевания и патологические состояния, обусловленные применением цитостатических препаратов, развиваются, как правило, в отдаленный период и характеризуются хроническим течением [5]. Частыми проявлениями отдаленных последствий применения цитостатических препаратов являются повторные онкологические заболевания, заболевания сердечно-сосудистой системы, нервной системы, эндокринопатии, патология глаз, женское и мужское бесплодие и др. [6, 7]. Риск летальных исходов у данной категории пациентов выше в 9–11 раз в сравнении с общей популяцией, при этом чуть более половины смертей (62.2 %) связаны с рецидивами первичного опухолевого процесса, а 22.4 % являются следствием проводившегося противоопухолевого лечения (вторые опухоли, сердечно-сосудистые заболевания и прочие поздние ятрогенные эффекты) [8].

В России общее количество мужчин с бесплодием увеличилось за период с 2000 по 2018 годы в 2.1 раза, при этом имеются региональные различия. Так, в Дальневосточном федеральном округе самые низкие показатели заболеваемости мужским бесплодием в России. Причины развития мужского бесплодия разнообразны: врожденные и приобретенные аномалии органов мочеполовой системы, инфекции мочевых и половых путей, повышение температуры в мошонке (варикоцеле), эндокринные нарушения, генетические аномалии и иммунологические факторы. Однако в 40–60 % случаев имеется единственная аномалия – патологическая спермограмма, а при объективном и лабораторном исследовании других аномалий не определяется. «Необъяснимые» формы мужского бесплодия могут быть вызваны такими факторами, как хронический стресс, эндокринные нарушения вследствие загрязнения окружающей среды, генетические аномалии и др. [9, 10]. Среди причин развития мужского бесплодия может быть прием лекарственных препаратов, особенно противоопухолевых средств и антибиотиков [11].

Вместе с тем механизмы повреждения половых желез у мужчин, вызванные токсическим действием препаратов, предназначенных для лечения гемобластозов: циклофосфамида [12], гидроксидаунорубина [13], винкристина [14] и преднизолона [15] (по схеме CHOP) – остаются недостаточно изученными.

tions of the late effects of the use of cytostatic drugs are recurrent cancers, diseases of the cardiovascular and nervous systems, endocrinopathies, ophthalmic pathology, female and male infertility, etc. [6, 7]. The risk of fatal outcome in this category of patients is 9–11 times higher compared to the general population, while a little over the half of deaths (62.2%) are associated with relapses of primary neoplastic process, and 22.4% are consequences of the anti-tumor treatment (second tumors, cardiovascular diseases and other late iatrogenic effects) [8].

In Russia, the total number of men with infertility increased by 2.1 times between 2000 and 2018, with regional differences. Thus, the Far Eastern Federal District has the lowest incidence of male infertility in Russia. The causes of male infertility are diverse: congenital and acquired genitourinary system abnormalities, urinary and genital tract infections, scrotal temperature rise (varicocele), endocrine disorders, genetic abnormalities and immunological factors. However, in 40–60% of cases there is a single anomaly – an abnormal spermogram, and no other abnormalities are revealed during clinical examination and lab tests. Unidentified forms of male infertility can be caused by such factors as chronic stress, endocrine disorders because of environmental pollution, genetic abnormalities, etc. [9, 10]. Among the causes of male infertility may be medication, especially use of anti-tumor drugs and antibiotics [11].

At the same time, the mechanisms of damage to male gonads because of the toxicity of drugs intended for the treatment of hematologic malignancies (cyclophosphamide [12], hydroxydaunorubicin [13], vincristine [14] and prednisolone [15] – CHOP regimen) remain insufficiently studied.

## AIM OF THE RESEARCH

To study the effect of chemotherapeutic agents on the morphological and functional state of the endocrine apparatus of testicles in experiment.

## MATERIALS AND METHODS

A case-control study was performed on 50 male Wistar rats aged 3 months and weighing 270–300 g. The animals were divided into 2 groups: group 1 included rats that did not receive chemotherapeutic agents (control group,  $n = 10$ ); group 2 (experimental) included rats, which received chemotherapeutic agents (CHOP regimen) for the treatment of hematologic malignancies ( $n = 40$ ). Group 2 rats received chemotherapeutic agents twice – on the 1st and 7th day [16]: cyclophosphamide (Cyclophosphamide, Baxter Oncology GmbH, Germany) – 21 mg/kg, hydroxydaunorubicin (Doxorubicin, Veropharm

## ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение влияния химиопрепаратов на морфофункциональное состояние эндокринного аппарата семенников в эксперименте.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведено исследование по типу «случай-контроль» на 50 крысах-самцах линии Wistar в возрасте 3 мес массой 270–300 г. Животных разделили на 2 группы: в 1-ю группу вошли крысы, не получавшие СНОР (группа контроля,  $n = 10$ ); во 2-ю (опытную) группу – крысы, получавшие комплекс химиопрепаратов группы СНОР, предназначенных для лечения гемобластозов ( $n = 40$ ). Крысам 2-й группы химиопрепараты вводили дважды – на 1-е и 7-е сутки [16]: циклофосфамид (Cyclophosphamide, «Бакстер Онкология ГмбХ», Германия) – 21 мг/кг, гидроксиданурубицин (Doxorubicin, АО «Верофарм», Россия) – 2.1 мг/кг, винкрестин (Vero-vincristine, АО «Верофарм», Россия) – 0.04 мг/кг и преднизолон (Россия) – 2.1 мг/кг.

Работа с животными осуществлялась в соответствии с ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами». Животные обеих групп содержались в одинаковых условиях вивария Амурской государственной медицинской академии при температуре 22–24 °C и влажности 50–65 %.

Эвтаназия животных проводилась методом декапитации под анестезией с соблюдением этических норм. Протокол эксперимента исследования на этапах содержания, моделирования и выведения животных из эксперимента соответствовал принципам биологической этики, изложенным в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (CIOMS, Страсбург, 1985), «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (Совет Европы, Страсбург, 1986), приказу Министерства здравоохранения РФ от 19.06.2003 № 267 «Об утверждении правил лабораторной практики».

У животных 2-й опытной группы забор крови и семенников проводили на 7-е ( $n = 10$ ), 14-е ( $n = 10$ ), 21-е ( $n = 10$ ) и 35-е ( $n = 10$ ) сутки. Образцы крови были помещены в вакуумные пробирки (Китай). Для иммуноферментных исследований использовали плазму крови, полученную цен-

JSC, Russia) – 2.1 мг/кг, vincristine (Vero-vincristine, Veropharm JSC, Russia) – 0.04 мг/кг and prednisolone (Russia) – 2.1 мг/кг.

The experiment was carried out in accordance with the GOST 33216-2014 “Guidelines for the maintenance and care of laboratory animals. Rules for the maintenance and care of laboratory rodents and rabbits”. The animals of both groups were kept in the same conditions of the vivarium of the Amur State Medical Academy at a temperature of 22–24°C and humidity of 50–65%.

Euthanasia of animals was performed by decapitation under anesthesia in compliance with ethical standards. The study protocol at the stages of keeping, modeling and removing animals from the experiment corresponded to the principles of biological ethics of the International Ethical Guidelines for Biomedical research involving animals (CIOMS, Strasbourg, 1985), European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental or for Other Scientific Purposes (Council of Europe, Strasbourg, 1986), Order of the Ministry of Health of the Russian Federation No. 267 dated 06/19/2003 “On approval of the Rules of Laboratory Practice”.

In animals of the 2nd group, the sampling of blood and testicles was performed on the 7th ( $n = 10$ ), 14th ( $n = 10$ ), 21st ( $n = 10$ ) and 35th ( $n = 10$ ) days. Blood samples were placed in vacuum tubes (China). For enzyme immunoassay, blood plasma was centrifuged for 10 minutes at 1300 g. All blood plasma samples were stored at –20°C before the tests. Concentrations of luteinizing hormone and testosterone were measured in blood plasma (CHEMA LLC, Russia). The study was performed on an Immunochem-2100 (USA) microplate reader as specified by manufacturer.

The prepared testicles (right and left separately) were weighed on a torsion balance. Next, the mass index (relative weight of testicles) was determined which is the ratio of the weight of the organ to the body weight of the animal expressed as a percentage.

Testicular samples were fixed in 10% neutral formalin, dehydrated in alcohols of increasing concentration (up to 100%). The material obtained was embedded being oriented in paraffin blocks in parallel to the section plane. The blocks were cut on a HistoSafe MicroCut-SA rotary microtome (China). Sections of 5 µm thickness were stained with hematoxylin and eosin according to the conventional technique. Then the material was examined on a Biomed 6 microscope (Russia) at magnifications ×100 and ×400. The images were processed in the Aperio ImageScope x64 program (Switzerland).

трифугированием в течение 10 мин при 1300 g. Все образцы плазмы крови хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$  до проведения анализов. В плазме крови определяли показатели лютеинизирующего гормона и тестостерона (ООО «ХЕМА», Россия). Исследование проводили на иммуноферментном анализаторе Immunochem-2100 (США) в соответствии с требованиями производителя.

Отпрепарированные семенники (по отдельности правый и левый) взвешивали на торсионных весах. Далее определяли массовый индекс (относительную массу мужских половых желез), который представляет собой отношение массы органа к массе тела животного, выраженное в процентах.

Образцы семенников фиксировали в 10% нейтральном формалине, обезжизняли в спиртах восходящей концентрации (до 100 %). Полученный материал заливали в парафиновые блоки, ориентируя фрагменты параллельно плоскости среза. Производили резку готовых блоков на ротационном микротоме HistoSafe MicroCut-SA (Китай). Срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином по общепринятой методике. Затем материал исследовали на микроскопе «Биомед 6» (Россия), при увеличении  $\times 100$  и  $\times 400$ . Полученные изображения обрабатывали в программе Aperio ImageScope  $\times 64$  (Швейцария).

О состоянии эндокринного аппарата семенников судили на основании анализа интерстициальных эндокриноцитов. Производили подсчет суммарного содержания клеток Лейдига, расположенных в межканальцевой соединительной ткани, в зависимости от их морфофункциональных типов, в том числе доли активных (больших и средних форм) и неактивных (малых) эндокриноцитов. Определяли объем клеток Лейдига ( $V_n$ ) по формуле и выражали в  $\text{мкм}^3$ :

$$V_n = 0.52 \times d_1^2 \times d_2,$$

где  $d_1$  – диаметр по короткой оси, мкм;  
 $d_2$  – диаметр по длинной оси, мкм.

Вычисляли коэффициент морфофункциональной активности клеток Лейдига ( $K_a$ ) по формуле, предложенной И.Ю. Макаровым, который показывает отношение функционально активных клеток Лейдига к неактивным:

$$K_a = (B + C) / M,$$

где B – процент больших клеток Лейдига;  
C – процент средних клеток Лейдига;  
M – процент малых клеток Лейдига.

Статистический анализ результатов исследования проводили при помощи стандартного

The state of the endocrine apparatus of testicles was assessed based on the analysis of interstitial endocrine cells (Leydig cells). We counted the total content of Leydig cells located in the intertubular connective tissue depending on their morphofunctional types, including the proportion of active (large- and medium-sized) and inactive (small-size) endocrine cells. The volume of Leydig cells ( $V_n$ ) was determined using the formula and expressed in  $\mu\text{m}^3$ :

$$V_n = 0.52 \times d_1^2 \times d_2,$$

where  $d_1$  – diameter along the short axis,  $\mu\text{m}$ ;  
 $d_2$  – diameter along the long axis,  $\mu\text{m}$ .

The coefficient of morphofunctional activity of Leydig cells ( $K_a$ ) which shows the ratio of functionally active Leydig cells to inactive cells was calculated according to the formula proposed by I.Yu. Makarov:

$$K_a = (L + M) / S,$$

where L – percentage of large-size Leydig cells;  
M – percentage of medium-size Leydig cells;  
S – percentage of small-size Leydig cells.

Statistical analysis of the study results was performed using Statistica 13.3 for Windows (StatSoft, USA) and Excel 2021. Given the small sample size and the lack of normal distribution of variables, the results are presented as median (Me) and upper and lower quartiles ( $Q_1$ ;  $Q_3$ ). Quantitative data were compared using the Mann-Whitney test. Differences were considered statistically significant at  $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ .

## RESULTS AND DISCUSSION

On the 7th day after a single administration of chemotherapeutic agents, in rats of the 2nd (experimental) group, the weight of testicles decreased compared with the same indicator in rats of the 1st (control) group by 2.32%; the difference in testicular weight between rats of the 2nd (experimental) group on the 7th and 14th days was 15.97%. Repeated administration of chemotherapeutic agents led to a significant testicular weight loss, which remained until the 21st day, while from the 21st day, an increase in their weight was observed. On day 35th, the weight of testicles in rats of the 2nd (experimental) group was 3.67% lower compared to the same indicator in rats of this group on the 21st day of the experiment (Table 1).

On histological examination of rats' testicles after a single administration of chemotherapeutic agents, the thickening of the membrane of proteins, congestion and edema of the stroma, thickening of blood vessel walls, frequently destruction of the elastic layer, edema of the interstitial cell islets, and diffuse

пакета Statistica 13.3 for Windows (StatSoft, США) и Excel 2021. Учитывая небольшой размер выборки и отсутствие нормальности распределения признаков, результаты представлены как медиана (Me) и верхний и нижний квартили (Q1; Q3). Сравнение количественных данных проводили с использованием критерия Манна – Уитни. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

У крыс во 2-й (опытной) группе после однократного введения химиопрепаратов масса семенников снижалась на 7-е сутки по сравнению с аналогичным показателем у крыс 1-й группы (контроль) на 2.32 %; разница в массе семенников между крысами 2-й (опытной) группы на 7-е и 14-е сутки составила 15.97 %. Повторное введение химиопрепаратов привело к значительной потере в массе семенников, сохранившейся вплоть до 21-х суток, а с 21-х суток наблюдалось увеличение их массы. На 35-е сутки масса семенников у крыс 2-й (опытной) группы в сравнении с аналогичным показателем у крыс этой же группы на 21-е сутки эксперимента была меньшей на 3.67 % (табл. 1).

При гистологическом исследовании семенников крыс после однократного введения комплекса химиопрепаратов наблюдалось утолщение белочной оболочки, полнокровие и отек стромы, утолщение стенок кровеносных сосудов, эластический слой часто подвергался разрушению, наблюдался отек в интерстициаль-

connective tissue overgrowth were observed. In the interstitium, endocrine cells (Leydig cells) in the form of clusters comprising 8–24 cells of various morphofunctional types (small-, medium-, large-size, among which small-size Leydig cells predominated) were identified (Fig. 1, 2). According to the literature, medium- and large-size Leydig cells are actively involved in steroid hormone production, whereas small-size cells represent an involutive and inactive form in relation to hormone production [17, 18].

Lipofuscin inclusions in individual Leydig cells were observed (Fig. 3), which confirmed the presence of atrophic changes in cells and could indicate inhibition of their functional activity.

Dynamic changes in the concentration of testosterone and luteinizing hormone in blood plasma of rats of the 1st (control) and 2nd (experimental) groups are presented in Table 2.

During the experiment, on the 7th day in rats of the 2nd (experimental) group after administration of chemotherapeutic drugs, a decrease in the total number of Leydig cells, in the diameter of their nucleus and their volume, and the accumulation of lipofuscin were registered, which correlated with an increase in the population of small-size cells by 4%. On the contrary, the number of functionally active medium- and large-size cells was reduced (Fig. 2).

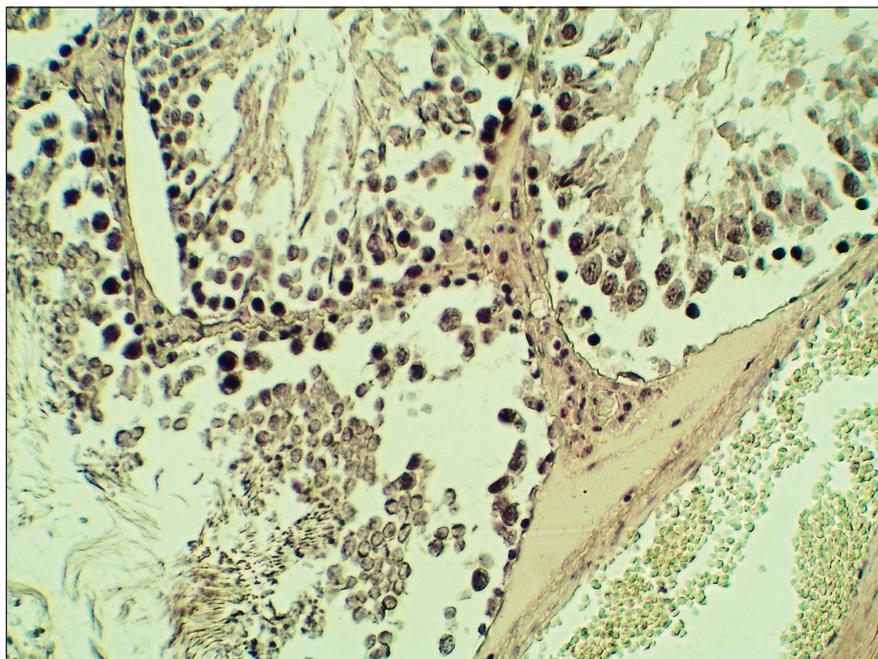
After repeated administration of chemotherapeutic agents on the 14th day, a decrease in the number of medium-size Leydig cells by 5%, an increase in small-size cells by 4% and large-size cells – by 1% was revealed in rats of the 2nd (experimental) group

**Таблица 1.** Масса половых желез крыс после введения противоопухолевых препаратов в динамике (Me)  
**Table 1.** Weight of male gonads of rats after the administration of anti-tumor drugs in dynamics (Me)

| Показатель<br>Indicator                       | Группа 2 (опытная) / Group 2 (experimental) |                         |                           |                         | Группа 1<br>(контроль)<br>Group 1<br>(control) | $P_{1,2,3,4,1-2}$ |
|---|---|-------------------------|---------------------------|-------------------------|--|-------------------|
|   | 7-е сутки<br>7th day                        | 14-е сутки<br>14th day  | 21-е сутки<br>21st day    | 35-е сутки<br>35th day  |  |                   |
| Размер выборки (n)<br>Sample size (n)         | 10  | 10                      | 10                        | 10                      | 10   |                   |
| Масса животных (г)<br>Animal weight (g)       | 276.5<br>(274.5; 280.5)                     | 272<br>(269.25; 274)    | 274.5<br>(271.25; 275.75) | 277<br>(275.25; 281.75) | 286<br>(284.25; 297.25)                        | <0.01             |
| Масса семенников (г)<br>Testicular weight (g) | 1.685<br>(1.672; 1.697)                     | 1.55<br>(1.532; 1.587)  | 1.6<br>(1.582; 1.63)      | 1.625<br>(1.582; 1.655) | 1.74<br>(1.72; 1.76)                           | <0,01             |
| Массовый индекс (%)<br>Mass index (%)         | 0.609<br>(0.608; 0.610)                     | 0.570<br>(0.569; 0.579) | 0.590<br>(0.584; 0.593)   | 0.577<br>(0.574; 0.585) | 0.599<br>(0.583; 0.623)                        | <0,01             |

П р и м е ч а н и е .  $p_{1,2,3,4,1-2}$ :  $p_1$  – достоверность различий между величинами показателей у крыс 2-й группы на 7-е сутки и крыс 1-й группы;  $p_2$  – у крыс 2-й группы на 14-е сутки и крыс 1-й группы;  $p_3$  – у крыс 2-й группы на 21-е сутки и крыс 1-й группы;  $p_4$  – у крыс 2-й группы на 35-е сутки и крыс 1-й группы;  $p_{1-2}$  – значимость различий между величинами показателей крыс 2-й группы на 7-е и 14-е сутки.

Н о т е .  $p_{1,2,3,4,1-2}$ :  $p_1$  – significance of differences between the values of the 2nd group on the 7th day and the 1st group;  $p_2$  – between the 2nd group on the 14th day and the 1st group;  $p_3$  – between the 2nd group on the 21st day and group 1;  $p_4$  – between the 2nd group on the 35th day and the 1st group;  $p_{1-2}$  – significance of differences between the values of the 2nd group on the 7th and 14th days.



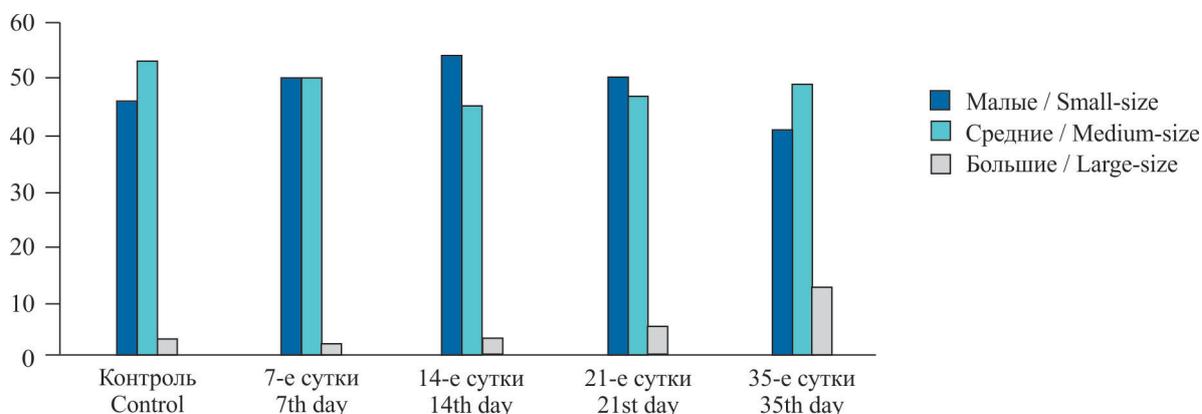
**Рис. 1.** Семенники крыс 2-й (опытной) группы на 7-е сутки. Выраженный отек стромы, отслоение оболочки канальцев от сперматогенного эпителия, разрыхление и истончение сперматогенного эпителия. Уменьшение количества клеток Лейдига, сопровождающееся кариопикнозом.

Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение ×50

**Fig. 1.** Testicles of rats of the 2nd (experimental) group on the 7th day. Pronounced edema of the stroma, detachment of the tubular membrane from the seminiferous epithelium, loosening and thinning of the seminiferous epithelium. A decrease in the number of Leydig cells, accompanied by karyopycnosis. Stained with hematoxylin and eosin. Magnification ×50

ных островках, диффузное разрастание соединительной ткани. В интерстиции определяли эндокриноциты (клетки Лейдига) в виде скоплений, состоящих из 8–24 клеток, различных морфофункциональных типов: малые, средние, большие, среди которых преобладали клетки Лейдига малых размеров (рис. 1, 2). Согласно литературным данным, клетки Лейдига средних и крупных размеров принимают

(Fig. 2). However, on the 21st day of the experiment, rats of the 2nd (experimental) group showed an increase in the number of medium- and large-size cells by 2%, compared with animals of the 2nd (experimental) group after repeated administration of chemotherapeutic drugs on the 14th day. On the 35th day of the experiment, in comparison with the 21st day, in rats of the 2nd (experimental) group, the number of small-size Leydig cells decreased by 9%,



**Рис. 2.** Динамика изменений количества морфофункциональных форм клеток Лейдига (%)  
**Fig. 2.** Dynamics of changes in the number of morphofunctional forms of Leydig cells (%)

**Таблица 2.** Динамика изменения концентрации половых гормонов в крови у крыс после введения противоопухолевых препаратов (Ме)**Table 2.** Dynamics of changes in the concentration of reproductive hormones in blood of rats after the administration of anti-tumor drugs (Me)

| Показатель<br>Indicator  | Группа 2 (опытная) / Group 2 (experimental) |                               |                         |                         | Группа 1<br>(контроль)<br>Group 1<br>(control) | $p_{1,2,3,4,1-2}$ |
|--|---|-------------------------------|-------------------------|-------------------------|--|-------------------|
|  | 7-е сутки<br>7th day                        | 14-е сутки<br>14th day        | 21-е сутки<br>21st day  | 35-е сутки<br>35th day  |  |                   |
| Размер выборки (n)<br>Sample size (n)                          | 10  | 10                            | 10                      | 10                      | 10   |                   |
| Лютеинизирующий<br>гормон (МЕ/л)<br>Luteinizing hormone (IU/l) | 16.692<br>(15.458;<br>17.926)               | 14.029<br>(12.041;<br>16.017) | 5.633<br>(4.226; 7.041) | 5.979<br>(4.874; 7.083) | 22.346<br>(20.825; 23.867)                     | <0.01             |
| Тестостерон (нмоль/л)<br>Testosterone (nmol/l)                 | 4.340<br>(4.192; 4.344)                     | 2.714<br>(2.385; 2.942)       | 3.196<br>(2.491; 4.051) | 3.971<br>(3.008; 4.934) | 9.116<br>(8.146; 9.801)                        | <0.01             |

П р и м е ч а н и е .  $p_{1,2,3,4,1-2}$ :  $p_1$  – достоверность различий между величинами показателей у крыс 2-й группы на 7-е сутки и крыс 1-й группы;  $p_2$  – у крыс 2-й группы на 14-е сутки и крыс 1-й группы;  $p_3$  – у крыс 2-й группы на 21-е сутки и крыс 1-й группы;  $p_4$  – у крыс 2-й группы на 35-е сутки и крыс 1-й группы;  $p_{1-2}$  – значимость различий между величинами показателей крыс 2-й группы на 7-е и 14-е сутки.

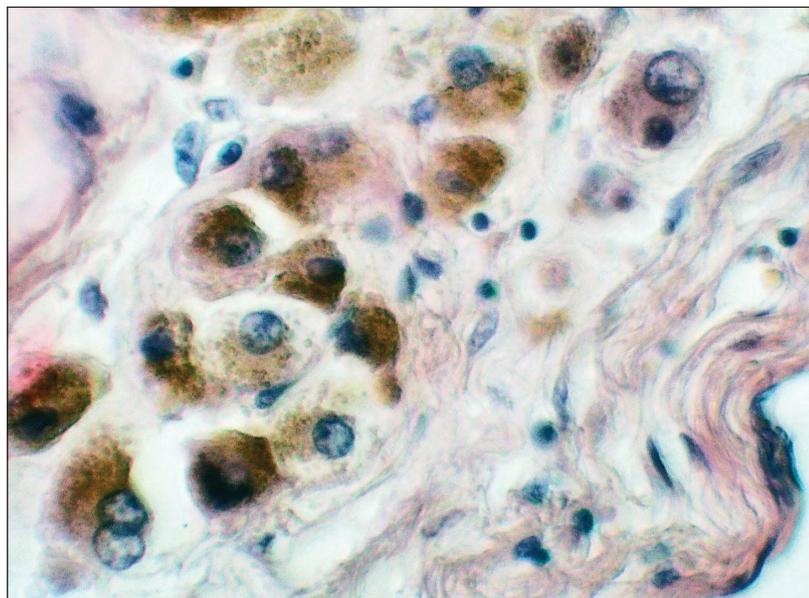
N o t e .  $p_{1,2,3,4,1-2}$ :  $p_1$  – significance of differences between the values of the 2nd group on the 7th day and the 1st group;  $p_2$  – between the 2nd group on the 14th day and the 1st group;  $p_3$  – between the 2nd group on the 21st day and group 1;  $p_4$  – between the 2nd group on the 35th day and the 1st group;  $p_{1-2}$  – significance of differences between the values of the 2nd group on the 7th and 14th days.

активное участие в продуцировании стероидных гормонов, тогда как клетки малых размеров представляют собой инволюционную и малоактивную форму в отношении продукции гормонов [17, 18].

В отдельных клетках Лейдига отмечались вкрапления липофусцина (рис. 3), что подтверждало наличие атрофических изменений клеток и

medium- and large-size increased by 2 and 7%, respectively (Fig. 2).

The results of the morphometric study showed that in Leydig cells in rats of the 2nd (experimental) group on the 7th day of the experiment cell volume decreased by 18.96% in comparison with the same indicator in rats of the 1st (control) group, while the nucleus diameter decreased by 1.92% (Table 3). The



**Рис. 3.** Семенники крыс 2-й (опытной) группы на 21-е сутки эксперимента. Интерстициальный островок представлен клетками Лейдига малых и больших форм с кариопикнозом, массивными отложениями липофусцина. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 400$

**Fig. 3.** Testicles of rats of the 2nd (experimental) group on the 21st day of the experiment.

The interstitial islet is represented by small and large Leydig cells with karyopycnosis, massive deposits of lipofuscin. Stained with hematoxylin and eosin. Magnification  $\times 400$

могло указывать на угнетение их функциональной активности.

Динамические изменения содержания тестостерона и лютеинизирующего гормона в плазме крови крыс в 1-й (контрольной) и 2-й (опытной) группах представлены в табл. 2.

В ходе эксперимента на 7-е сутки у крыс 2-й (опытной) группы после введения комплекса химиопрепаратов было отмечено снижение общего количества клеток Лейдига, уменьшение диаметра их ядра и объема, накопление липофусцина, что коррелировало с увеличением популяции клеток малых форм на 4 %. Число функционально активных клеток средних и больших размеров, наоборот, было снижено (см. рис. 2).

После повторного введения химиопрепаратов на 14-е сутки у крыс 2-й (опытной) группы было выявлено уменьшение количества клеток Лейдига средних размеров на 5 %, увеличение малых размеров – на 4 % и больших форм – на 1 % (см. рис. 2). Однако на 21-е сутки эксперимента у крыс 2-й (опытной) группы отмечалось увеличение количества клеток средних и больших размеров на 2 % в сравнении с животными 2-й (опытной) группы после повторного введения химиопрепаратов на 14-е сутки. На 35-е сутки эксперимента в сравнении с 21-ми сутками у крыс 2-й (опытной) группы количество малых форм клеток Лейдига уменьшалось на 9 %, средних и больших размеров увеличивалось соответственно на 2 и 7 % (см. рис. 2).

Результаты морфометрического исследования показали, что в клетках Лейдига у крыс 2-й (опытной) группы на 7-е сутки эксперимента уменьшился объем клетки на 18.96 % в сравнении с аналогичным показателем у крыс 1-й контрольной группы, при уменьшении диаметра ядра на 1.92 % (табл. 3). Общее количество клеток Лейдига снижалось на 4.7 %, что сопровождалось снижением концентрации тестостерона на 52.4 % (см. табл. 2), что коррелировало со снижением коэффициента активности (см. табл. 3).

На 14-е сутки у крыс 2-й (опытной) группы диаметр ядра уменьшался на 2.09 %, объем клетки – на 19.97 %, а концентрация тестостерона в плазме крови – на 28.77 %, что было значительно меньшим в сравнении с величиной показателя у крыс 1-й (контрольной) группы. Коэффициент активности клеток Лейдига был снижен. По мере нарастания дистрофических нарушений в клетках Лейдига происходило снижение уровня тестостерона – вплоть до 2.385 нмоль/л (см. табл. 2). Стоит отметить, что на фоне резкого снижения уровня тестостерона показатель лютеинизирующего гор-

total number of Leydig cells decreased by 4.7%, accompanied by a 52.4% decrease in testosterone concentration (Table 2), which correlated with a decrease in the coefficient of Leydig cell activity (Table 3).

On the 14th day in rats of the 2nd (experimental) group the nucleus diameter decreased by 2.09 %, cell volume – by 19.97 %, and the testosterone concentration in blood plasma – by 28.77 %, which was significantly lower in comparison with the value of the 1st (control) group. The coefficient of Leydig cell activity was reduced. As the degenerative impairments in Leydig cells increased, the testosterone level reduced to 2.385 nmol/l (Table 2). It should be noted that amid a sharp decrease in the testosterone level, the luteinizing hormone level value was also decreased by 37.21%, which could indicate degenerative processes in the endocrine apparatus of the testicles.

In the animals of the 2nd (experimental) group, on the 21st day there was a gradual increase in the volume and diameter of Leydig cells, thereby, the difference between the rats of the 1st and the 2nd groups on the 21st day was 9.28  $\mu\text{m}^3$ . Despite the insignificant difference in the size of Leydig cells between the animals of the 1st and 2nd groups on the 21st day, the difference in the testosterone values was significant and amounted to 65.1%, luteinizing hormone – 74.78%, which can be associated with a 21.3% decrease in the total number of Leydig cells and an increase in small-size Leydig cells. At the same time, the coefficient of Leydig cell activity amounted to 1.04.

On the 35th day, in rats of the 2th (experimental) group we had the following figures: the volume and nucleus diameter of Leydig cells increased by 9.392  $\mu\text{m}^3$ , however, it should be noted that with the increase in the nucleus diameter and volume of endocrine cells, simultaneously, a decrease in the total number of Leydig cells by 25% takes place. In animals of the 2nd (experimental) group, on the 35th day compared to the 21st day, there was an increase in the testosterone level. The coefficient of Leydig cell activity amounted to 1.136, which correlated with higher testosterone levels during this period (3.971 nmol/l) (Table 2). Thus, the difference of the testosterone concentration between 21st and 35th days in the 2nd (experimental) group was 24.4%, on the 35th day, in rats of the 2nd (experimental) group and animals of the 1st (control) group the difference was 56.4%.

During the morphofunctional study of the endocrine apparatus of the rat testicles, it was found that the severity of degenerative and atrophic processes increases with the growth of the chemotherapeutic

**Таблица 3.** Результаты морфометрического исследования клеток Лейдига семенников крыс при применении противоопухолевой химиотерапии (Me)**Table 3.** Results of morphometric study of testicular Leydig cells after the administration of anti-tumor drugs (Me)

| Показатель<br>Indicator   | Группа 2 (опытная) / Group 2 (experimental) |                          |                           |                               | Группа 1<br>(контроль)<br>Group 1<br>(control) | p  |
|---|---|--------------------------|---------------------------|-------------------------------|--|--|
|   | 7-е сутки<br>7th day                        | 14-е сутки<br>14th day   | 21-е сутки<br>21st day    | 35-е сутки<br>35th day        |  |  |
| Размер выборки (n)<br>Sample size (n)   | 10  | 10                       | 10                        | 10                            | 10   |  |
| Диаметр ядра клетки<br>Лейдига (мкм)<br>Leydig cell nucleus<br>diameter (μm)                | 6.115<br>(6.082; 6.142)                     | 6.08<br>(6.035; 6.127)   | 6.16<br>(6.122; 6.177)    | 6.235<br>(6.185; 6.295)       | 6.21<br>(6.182 6.285)                          | p <sub>1</sub> < 0.01<br>p <sub>2</sub> < 0.01<br>p <sub>3</sub> < 0.01                            |
| Объем клетки Лейдига<br>(мкм <sup>3</sup> )<br>Leydig cell volume (μm <sup>3</sup> )        | 38.349<br>(31.783;<br>39.082)               | 37.685<br>(31.012; 40.4) | 38.035<br>(33.345; 41.43) | 47.427<br>(40.584;<br>53.107) | 47.315<br>(46.905; 48.818)                     | p <sub>1</sub> < 0.01<br>p <sub>2</sub> < 0.01<br>p <sub>3</sub> < 0.01                            |
| Относительное<br>количество клеток<br>Лейдига (n)<br>Relative number of<br>Leydig cells (n) | 10.3 (9.7; 10.6)                            | 10.8<br>(10.4; 11.2)     | 8.5 (8.1; 8.8)            | 8.1 (7.7; 8.8)                | 10.8 (10.4; 11.2)                              | p <sub>1</sub> < 0.05<br>p <sub>2</sub> < 0.01<br>p <sub>4</sub> < 0,01<br>p <sub>1-2</sub> < 0.01 |
| Коэффициент<br>активности клеток<br>Лейдига<br>Coefficient of Leydig cell<br>activity       | 1.043<br>(1.015; 1.102)                     | 1.015<br>(1.012; 1.037)  | 1.091<br>(1.047; 1.118)   | 1.136<br>(1.113; 1,21)        | 1.189<br>(1.171; 1.215)                        | p <sub>1</sub> < 0.01<br>p <sub>2</sub> < 0.01<br>p <sub>3</sub> < 0.01                            |

мона также был снижен на 37.21 %, что могло свидетельствовать о дистрофических процессах в эндокринном аппарате семенников.

У животных 2-й опытной группы на 21-е сутки отмечалось постепенное увеличение объема и диаметра клеток Лейдига, вследствие чего разница между крысами 1-й и 2-й группы на 21-е сутки составила 9.28 мкм<sup>3</sup>. Несмотря на незначительную разницу в размере клеток Лейдига между животными 1-й и 2-й группы на 21-е сутки, разница в показателях тестостерона была значительной и составила 65.1 %, лютеинизирующего гормона – 74.78 %, что можно связать с уменьшением общего количества клеток Лейдига на 21.3 % и увеличением клеток Лейдига малого размера. При этом коэффициент активности клеток Лейдига составил 1.04.

На 35-е сутки у крыс 2-й (опытной) группы отмечается следующая картина: объем клеток Лейдига и диаметр ядра увеличивался на 9.392 мкм<sup>3</sup>, однако стоит отметить, что одновременно с увеличением диаметра ядер и объема эндокриноцитов происходит уменьшение общего количества клеток Лейдига на 25 %. У животных 2-й опытной группы на 35-е сутки в сравнении с 21-ми сутками отмечалось увеличение уровня тестостерона. Коэффициент активности клеток Лейдига составил 1.136, что соотносилось с более высокими показателями тестостерона в этой

agent concentration in the body, which unequivocally indicates the depression of hormone-producing function of these cells. The toxic effect of the chemotherapeutic drugs (CHOP regimen) led to pathomorphological changes (atrophic processes) in the clusters of Leydig cells, a decrease in the size of nuclei and volume of endocrine cells, as well as a decrease in the total number of cells already on the 7th day after administration of chemotherapeutic agents, which correlated with a decrease in the testosterone concentration in blood plasma. From the 21st day on, the compensatory and adaptive changes occur in the endocrine apparatus of the testicles – an increase in the number of large-size endocrine cells with the persisting high number of small-size ones, which, in our opinion, leads to an increase in the coefficient of Leydig cell activity and gradual restoration of hormone-producing function, therefore, an increase in the testosterone concentration, despite the reduced relative number of Leydig cells, as well as the remaining small size of the nuclei and the cell volume. On the 35th day, changes in the form of accumulation of lipofuscin in endocrine cells were observed, which could occur because of hypoxia due to the vascular wall thickening and the luminal occlusion of the vessels of the microcirculatory bed. On the 35<sup>th</sup> day, there was a decrease in the number of small-size Leydig cells and an increase in medium- and large-size endocrine cells,

период наблюдения (3,971 нмоль/л) (см. табл. 2). Таким образом, разница уровня концентрации тестостерона между 21-ми сутками и 35-ми сутками во 2-й опытной группе составила 24.4 %, к 35-м суткам разница между крысами 2-й (опытной) группы и животными 1-й группы (контроль) разница составила 56.4 %.

При морфофункциональном исследовании эндокринного аппарата семенников крыс было установлено, что степень выраженности дистрофических и атрофических процессов усиливается с повышением концентрации химиопрепаратов в организме, что однозначно указывает на угнетение гормонпродуцирующей функции этих клеток. Токсическое действие комплекса препаратов СНОР приводило к патоморфологическим изменениям в интерстициальных островках в виде атрофических процессов, уменьшения размера ядер и объема эндокриноцитов, а также к уменьшению общего количества клеток уже на 7-е сутки после введения химиопрепаратов, что, в свою очередь, коррелировало с уменьшением концентрации тестостерона в плазме крови. Начиная с 21-х суток в эндокринном аппарате семенников возникают компенсаторно-приспособительные изменения в виде увеличения количества больших форм эндокриноцитов на фоне высокого показателя количества малых форм, что, по нашему мнению, приводит к повышению коэффициента активности клеток Лейдига и постепенному восстановлению гормонпродуцирующей функции с увеличением концентрации тестостерона в плазме крови, несмотря на сниженное относительное количество клеток Лейдига, а также сохраняющийся малый размер ядер и сниженный объем клеток. На 35-е сутки отмечались изменения в виде накопления в эндокриноцитах липофусцина, что могло возникнуть на фоне гипоксии, возникшей вследствие утолщения стенки и уменьшения просвета сосудов микроциркуляторного русла. На 35-е сутки происходило уменьшение количества клеток Лейдига малых форм и увеличение средних и больших форм эндокриноцитов, что, в свою очередь, коррелировало с увеличением уровня тестостерона в плазме крови.

Результаты экспериментального исследования, полученные в ходе изучения морфометрических показателей клеток Лейдига и уровня гормонов, не противоречат данным исследований [10, 19]. Дальнейшее изучение влияния химиотерапии открывает перспективы для способов коррекции последствий препаратов группы СНОР на организм, в частности, на репродуктивную функцию.

which in turn correlated with an increase in serum testosterone levels.

The results of the experiment obtained during the study of morphometric parameters of Leydig cells and hormone levels do not contradict the previous research data [10, 19]. Further study of the effect of chemotherapy opens up prospects for ways to correct the negative influence of CHOP chemotherapy on the body, in particular, on reproductive function.

## CONCLUSION

The performed study allows us to draw the following conclusions:

1. A twofold administration of anti-tumor drugs in the CHOP regimen (7th and 14th days) in rats was accompanied by a decrease in testicular weight, degenerative and atrophic changes in islets of interstitial (Leydig) cells, and a decrease in the testosterone concentration in blood plasma.

2. By the 35th day of the experiment, rats of the experimental group developed compensatory and adaptive reactions characterized by a relative restoration of testicular weight, an increase in medium- and large-size Leydig cells and the testosterone level in blood plasma.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование позволяет сделать следующие выводы:

1. Двукратное применение противоопухолевых препаратов комплекса СНОР (7-е и 14-е сутки) у крыс сопровождалось снижением массы семенников, дистрофическими и атрофическими изменениями в островках интерстициальных клеток (Лейдига), уменьшением концентрации тестостерона в плазме крови.

2. К 35-м суткам эксперимента у крыс опытной группы развивались компенсаторно-приспособительные реакции, характеризующиеся относительным восстановлением массы семенников, увеличением средних и больших форм эндокриноцитов (клеток Лейдига) и уровня тестостерона в плазме крови.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Poorvu P.D., Feraco A.M., Frazier L. et al. Cancer treatment-related infertility: a critical review of the evidence // *JNCI Cancer Spectr.* 2019;3(1):pkz008. DOI: 10.1093/jncics/pkz008.
- Moreno F., Stelianova-Foucher E., Colombet M. et al. International incidence of childhood cancer, 2001–10: a population-based registry study // *Lancet Oncol.* 2017;18(6):719-731. DOI: 10.1016/S1470-2045(17)30186-9.
- ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России. Статистический сборник. URL: <https://nmicr.ru/nauka/nashi-izdaniya/statisticheskiy-sbornik/> (дата обращения: 20.08.2024).
- Zraik I.M., Heß-Busch Y. Management of chemotherapy side effects and their long-term sequelae // *Urologe A.* 2021;60(7):862-871. DOI: 10.1007/s00120-021-01569-7.
- Жуковская Е.В. Коморбидная патология у пациентов, излеченных от гемобластозов, на этапах реабилитации // *Российский журнал детской гематологии и онкологии.* 2019;6(51):145.
- Борисевич М.В., Кальченко К.О., Быданов О.И. Отдаленные последствия противоопухолевого лечения детей с рабдомиосаркомой в Республике Беларусь // *Гематология. Трансфузиология. Восточная Европа.* 2021;7(4):405-415. DOI: 10.34883/PI.2021.7.4.001.
- Bhakta N., Liu Q., Ness K.K. et al. The cumulative burden of surviving childhood cancer: an initial report from the St Jude Lifetime Cohort Study (SJLIFE) // *Lancet.* 2017;390(10112):2569-2582. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)31610-0.
- Колыгин Б.А., Кулева С.А. Отдаленные последствия противоопухолевой терапии, проведенной в детском и подростковом возрасте // *Medline.ru. Российский биомедицинский журнал.* 2011;12:50-68.
- Лебедев Г.С., Голубев Н.А., Шадеркин И.А. и др. Мужское бесплодие в Российской Федерации: статистические данные за 2000–2018 годы // *Экспериментальная и клиническая урология.* 2019;4:4-13. DOI: 10.29188/2222-8543-2019-11-4-4-12.
- Жебентяев А.А. Мужское бесплодие // *Вестник Витебского государственного медицинского университета.* 2008;7(2):76-83.
- Пятакова Е.И., Баландин А.Н., Рябыкина А.В. и др. О нерациональном применении антибиотиков как одной из причин мужского бесплодия // *Общественное здоровье и здравоохранение.* 2009;2(22):44-46.
- Anan H.H., Wahba N.S., Abdallah M.A., Mohamed D.A. Histological and immunohistochemical study of cyclophosphamide effect on adult rat testis // *Int. J. Sci. Rep.* 2017;3(2):39-48. DOI: 10.18203/issn.2454-2156.IntJSciRep20170356.
- Sjöblom T., West A., Lähdetie J. Apoptotic response of spermatogenic cells to the germ cell mutagens etoposide, adriamycin, and diepoxybutane // *Environ. Mol. Mutagen.* 1998;31(2):133-148. DOI: 10.1002/(sici)1098-2280(1998)31:2<133::aid-em5>3.0.co;2-n.
- Clark I., Brougham M.F.H., Spears N., Mitchell R.T. The impact of vincristine on testicular development and function in childhood cancer // *Hum. Reprod.*

## REFERENCES

- Poorvu P.D., Feraco A.M., Frazier L. et al. Cancer treatment-related infertility: a critical review of the evidence. *JNCI Cancer Spectr.* 2019;3(1):pkz008. DOI: 10.1093/jncics/pkz008.
- Moreno F., Stelianova-Foucher E., Colombet M. et al. International incidence of childhood cancer, 2001–10: a population-based registry study. *Lancet Oncol.* 2017;18(6):719-731. DOI: 10.1016/S1470-2045(17)30186-9.
- National Medical Research Radiological Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation. Statistical book. URL: <https://nmicr.ru/nauka/nashi-izdaniya/statisticheskiy-sbornik/> (accessed 20.08.2024).
- Zraik I.M., Heß-Busch Y. Management of chemotherapy side effects and their long-term sequelae. *Urologe A.* 2021;60(7):862-871. DOI: 10.1007/s00120-021-01569-7.
- Zhukovskaya E.V. Comorbidities in patients – hematologic malignancy survivors during rehabilitation. *Russian Journal of Pediatric Hematology and Oncology.* 2019;6(51):145. (In Russ.)
- Borisevich M.V., Kalchenko K.O., Bydanov O.I. Late effects of cancer therapy in children with rhabdomyosarcoma in Belarus. *Hematology. Transfusiology. Eastern Europe.* 2021;7(4):405-415. DOI: 10.34883/PI.2021.7.4.001. (In Russ.)
- Bhakta N., Liu Q., Ness K.K. et al. The cumulative burden of surviving childhood cancer: an initial report from the St Jude Lifetime Cohort Study (SJLIFE). *Lancet.* 2017;390(10112):2569-2582. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)31610-0.
- Kolygin B.A., Kulyova S.A. Late effects of childhood and adolescent cancer therapy. *Medline.ru. Russian Biomedical Journal.* 2011;12:50-68. (In Russ.)
- Lebedev G.S., Golubev N.A., Shaderkin I.A. et al. Male infertility in the Russian Federation: statistical data for 2000–2018. *Experimental and Clinical Urology.* 2019;4:4-13. DOI: 10.29188/2222-8543-2019-11-4-4-12. (In Russ.)
- Zhebentyaev A.A. Male infertility. *Vitebsk Medical Journal.* 2008;7(2):76-83. (In Russ.)
- Pyatakova E.I., Balandin A.N., Ryabykina A.V. et al. About irrational use of antibiotics as one of the reasons of male sterility. *Public Health and Health Care.* 2009;2(22):44-46. (In Russ.)
- Anan H.H., Wahba N.S., Abdallah M.A., Mohamed D.A. Histological and immunohistochemical study of cyclophosphamide effect on adult rat. *Int. J. Sci. Rep.* 2017;3(2):39-48. DOI: 10.18203/issn.2454-2156.IntJSciRep20170356.
- Sjöblom T., West A., Lähdetie J. Apoptotic response of spermatogenic cells to the germ cell mutagens etoposide, adriamycin, and diepoxybutane. *Environ. Mol. Mutagen.* 1998;31(2):133-148. DOI: 10.1002/(sici)1098-2280(1998)31:2<133::aid-em5>3.0.co;2-n.
- Clark I., Brougham M.F.H., Spears N., Mitchell R.T. The impact of vincristine on testicular development and function in childhood cancer. *Hum. Reprod. Update.* 2023;29(2):233-245. DOI: 10.1093/humupd/dmac039.
- Tacey A., Parker L., Yeap B.B. et al. Single-dose prednisolone alters endocrine and haematologic responses

- Update. 2023;29(2):233-245. DOI: 10.1093/humupd/dmac039.
15. Tacey A., Parker L., Yeap B.B. et al. Single-dose prednisolone alters endocrine and haematologic responses and exercise performance in men // *Endocr. Connect.* 2019;8(2):111-119. DOI: 10.1530/EC-18-0473.
  16. Fisher R.I., Gaynor R.E., Dahlberg S. et al. Comparison of standard regimen (CHOP) with three intensive chemotherapy regimens for advanced non-Hodgkin's lymphoma // *N. Engl. J. Med.* 1993;328(14):1002-1006. DOI: 10.1056/NEJM199304083281404.
  17. Bergh A. Local differences in Leydig cell morphology in the adult rat testis: evidence for a local control of Leydig cells by adjacent seminiferous tubules // *Int. J. Androl.* 1982;5(3):325-330. DOI: 10.1111/j.1365-2605.1982.tb00261.x.
  18. Mori H., Christensen A.K. Morphometric analysis of Leydig cells in the normal rat testis // *J. Cell. Biol.* 1980;84(2):340-354. DOI: 10.1083/jcb.84.2.340.
  19. Абрамкин Э.Э., Меньщикова Н.В., Макаров И.Ю. Влияние препаратов, применяющихся при лечении гемобластозов, на морфофункциональное состояние сперматозоидов // *Бюллетень физиологии и патологии дыхания.* 2024;91:98-105. DOI: 10.36604/1998-5029-2024-91-98-105.
  - and exercise performance in men. *Endocr. Connect.* 2019;8(2):111-119. DOI: 10.1530/EC-18-0473.
  16. Fisher R.I., Gaynor R.E., Dahlberg S. et al. Comparison of standard regimen (CHOP) with three intensive chemotherapy regimens for advanced non-Hodgkin's lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 1993;328(14):1002-1006. DOI: 10.1056/NEJM199304083281404.
  17. Bergh A. Local differences in Leydig cell morphology in the adult rat testis: evidence for a local control of Leydig cells by adjacent seminiferous tubules. *Int. J. Androl.* 1982;5(3):325-330. DOI: 10.1111/j.1365-2605.1982.tb00261.x.
  18. Mori H., Christensen A.K. Morphometric analysis of Leydig cells in the normal rat testis. *J. Cell. Biol.* 1980;84(2):340-354. DOI: 10.1083/jcb.84.2.340.
  19. Abramkin E.E., Menshikova N.V., Makarov I.Y. The effect of drugs used in the treatment of hemoblastosis on the morphofunctional state of spermatozoa. *Bulletin Physiology and Pathology of Respiration.* 2024;91:98-105. DOI: 10.36604/1998-5029-2024-91-98-105. (In Russ.)

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

**Абрамкин Эдуард Эдуардович** – ассистент кафедры патологической анатомии с курсом судебной медицины ФГБОУ ВО «Амурская государственная медицинская академия» Минздрава России, Благовещенск, Россия. ORCID: 0009-0004-8116-0707.

**Макаров Игорь Юрьевич** – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой патологической анатомии с курсом судебной медицины ФГБОУ ВО «Амурская государственная медицинская академия» Минздрава России, Благовещенск, Россия. ORCID: 0000-0001-7243-6282.

**Меньщикова Наталья Валерьевна** – канд. мед. наук, доцент кафедры патологической анатомии с курсом судебной медицины ФГБОУ ВО «Амурская государственная медицинская академия» Минздрава России, Благовещенск, Россия. ORCID: 0000-0003-4427-1737.

**Абрамкина Альбина Александровна** – ординатор кафедры патологической анатомии с курсом судебной медицины ФГБОУ ВО «Амурская государственная медицинская академия» Минздрава России, Благовещенск, Россия. ORCID: 0009-0000-8418-6823.

**Надеев Александр Петрович** – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой патологической анатомии ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0003-0400-1011.

**Логина Анастасия Борисовна** – ординатор ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России, Москва, Россия. ORCID: 0000-0003-2876-4566.

## ABOUT THE AUTHORS

**Eduard E. Abramkin** – Assistant, Departments of Pathological Anatomy with a Course in Forensic Medicine, Amur State Medical Academy, Blagoveshchensk, Russia. ORCID: 0009-0004-8116-0707.

**Igor Yu. Makarov** – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head, Departments of Pathological Anatomy with a Course in Forensic Medicine, Amur State Medical Academy, Blagoveshchensk, Russia. ORCID: 0000-0001-7243-6282.

**Natalia V. Menshchikova** – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Departments of Pathological Anatomy with a Course in Forensic Medicine, Amur State Medical Academy, Blagoveshchensk, Russia. ORCID: 0000-0003-4427-1737.

**Albina A. Abramkina** – Post-graduate Student, Departments of Pathological Anatomy with a Course in Forensic Medicine, Amur State Medical Academy, Blagoveshchensk, Russia. ORCID: 0009-0000-8418-6823.

**Alexander P. Nadeev** – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head, Department of Pathological Anatomy, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0003-0400-1011.

**Anastasia B. Loginova** – Post-graduate Student, National Medical Research Center for Hematology, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0003-2876-4566.

## Фармакогностическое исследование и диагностические признаки травы оносмы простейшей

В.В. Величко, Д.С. Круглов, Е.Д. Олешко

ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия

### АННОТАЦИЯ

**В в е д е н и е .** Растения рода *Onosma* широко используются в народной медицине стран Азии. Широкий спектр фармакологического действия фитопрепаратов, полученных из этих растений, обусловлен разнообразием биологически активных соединений (БАС). В то же время широко распространенный в России вид оносмы – *Onosma simplicissima* L. – изучен недостаточно.

**Ц е л ь .** Фармакогностическое исследование травы оносмы простейшей.

**М а т е р и а л ы и м е т о д ы .** Объектом исследования служила надземная часть *Onosma simplicissima* L., собранная в фазу цветения. Суммарные экстракты из сырья, полученные с использованием в качестве экстрагентов водно-спиртовых смесей и 2% хлороводородной кислоты, применяли для качественного и количественного анализа компонентов растительного сырья с использованием спектрофотометрического и гравиметрического методов. Исследование микроморфологии листьев и цветов проводили с использованием микроскопа Zeiss Axio Scope.A1.

**Р е з у л ь т а т ы .** В сырье было обнаружено и определено количественное содержание следующих БАС: полисахариды – 5.4 %, полифлавановые соединения – 3.2 %, хлорофилл а – 0.46 %, хлорофилл b – 0.29 %, сумма каротиноидов и ксантофиллов – 0.03 %, флавоноиды (в пересчете на рутин) – 0.98 % и гидроксикоричные кислоты (в пересчете на дикофеилхинную кислоту) – 0.34 %.

В результате микроскопического анализа морфологии листьев были установлены три типа трихом, по которым можно диагностировать подлинность сырья.

**З а к л ю ч е н и е .** Наличие БАС, обладающих противовоспалительным, бактерицидным и регенеративным действием, создает предпосылки для более детального изучения оносмы простейшей как перспективного источника растительного сырья.

**Ключевые слова:** *Onosma simplicissima* L., рутин, дикофеилхинная кислота, хлорофилл, каротиноиды, полисахариды, алкалоиды.

**Образец цитирования:** Величко В.В., Круглов Д.С., Олешко Е.Д. Фармакогностическое исследование и диагностические признаки травы оносмы простейшей // Journal of Siberian Medical Sciences. 2024;8(3):115-126. DOI: 10.31549/2542-1174-2024-8-3-115-126

## A pharmacognostic study and diagnostic signs of *Onosma simplicissima* herb

V.V. Velichko, D.S. Kruglov, E.D. Oleshko

Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia

### ABSTRACT

**I n t r o d u c t i o n .** Plants of the genus *Onosma* are widely used in Asian folk medicine. The wide range of pharmacological effects of herbal medicines from these plants is due to the variety of biologically active compounds (BAC). At the

Поступила в редакцию 12.01.2024  
Прошла рецензирование 22.01.2024  
Принята к публикации 07.02.2024

*Автор, ответственный за переписку*  
Величко Виктория Владимировна: ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России. 630091, г. Новосибирск, Красный просп., 52.  
E-mail: velichkvik@rambler.ru

Received 12.01.2024  
Revised 22.01.2024  
Accepted 07.02.2024

*Corresponding author*  
Victoriya V. Velichko: Novosibirsk State Medical University, 52, Krasny prosp., Novosibirsk, 630091, Russia.  
E-mail: velichkvik@rambler.ru

same time, the widespread species of the genus *Onosma* in Russia – *Onosma simplicissima* L. – has been studied insufficiently.

**A i m .** A pharmacognostic study of *Onosma simplicissima* herb.

**M a t e r i a l s a n d m e t h o d s .** The object of the study was the aerial part of *Onosma simplicissima* L., collected during the flowering phase. Total extracts from the raw materials obtained using water-ethanol mixtures and 2% hydrochloric acid as extractants were used for qualitative and quantitative analysis of plant components using spectrophotometric and gravimetric methods. The micromorphology of leaves and flowers was studied using a Zeiss Axio Scope.A1 microscope.

**R e s u l t s .** The following BAC were detected and quantified in the raw materials: polysaccharides – 5.4%, polyflavone compounds – 3.2%, chlorophyll a – 0.46%, chlorophyll b – 0.29%, the sum of carotenoids and xanthophylls – 0.03%, flavonoids (in terms of rutin) – 0.98% and hydroxycinnamic acids (in terms of dicaffeoylquinic acid) – 0.34%.

During the microscopic analysis of leaf morphology, three types of trichomes were determined which can be used for identification of the raw materials.

**C o n c l u s i o n .** The presence of BAC with anti-inflammatory, antibacterial and regenerative effects indicates the needs for an elaborate study of *Onosma simplicissima* as a promising source of herbal raw materials.

**Keywords:** *Onosma simplicissima* L., rutin, dicaffeoylquinic acid, chlorophyll, carotenoids, polysaccharides, alkaloids.

**Citation example:** Velichko V.V., Kruglov D.S., Oleshko E.D. A pharmacognostic study and diagnostic signs of *Onosma simplicissima* herb. *Journal of Siberian Medical Sciences*. 2024;8(3):115-126. DOI: 10.31549/2542-1174-2024-8-3-115-126

## ВВЕДЕНИЕ

Оносма (о.) простейшая (*Onosma (O.) simplicissima* L.) – многолетнее травянистое растение, относящееся к роду оносма (*Onosma* L.) семейства бурачниковые (*Boraginaceae*), который включает в себя около 230 видов растений, распространенных по всему земному шару [1]. Ареал оносмы простейшей ограничен степной зоной европейской части России и Южной Сибири, она произрастает также на территории Восточного Казахстана и Западной Монголии [2].

Традиционно в народной медицине корни растений рода *Onosma* L. используются для лечения ревматизма, при болях в мочевом пузыре, раздражении почек, сердцебиении в качестве мочегонного, жаропонижающего, вяжущего и успокаивающего средства. В Индии оносму используют при лечении гипертонии, лихорадки и нервных состояний. В Турции эти растения используются для лечения воспалительных заболеваний, таких как тонзиллит, геморрой, бронхит, болевого синдрома [3]. Надземная часть о. прицветковой (*O. bracteatum* Wall.) на Ближнем Востоке используется в качестве тонизирующего средства, а также для лечения астмы, бронхита, болезней мочевыводящей системы в качестве мочегонного, противовоспалительного и спазмолитического средства. Листья о. синяковидной (*O. echioides* DC) используются в качестве слабительного средства, а цветки – как стимулирующее средство при лечении ревматизма и сердцебиения [4].

## INTRODUCTION

*Onosma (O.) simplicissima* L. is a perennial herbaceous plant belonging to the genus *Onosma* L. of the *Boraginaceae* family which includes about 230 species have been growing throughout the world [1]. The range of *Onosma simplicissima* is limited to the steppe area of European Russia and Southern Siberia; it also grows in Eastern Kazakhstan and Western Mongolia [2].

In folk medicine, the roots of *Onosma* plants are used to treat rheumatism, bladder pain, kidney disorders, palpitations as diuretic, antipyretic, astringent and sedative agents. In India, *Onosma* plants are used in the treatment of hypertension, fever and nervous conditions. In Turkey, these plants are used to treat inflammatory diseases such as tonsillitis, hemorrhoids, bronchitis, and pain syndrome [3]. The aerial part of *O. bracteatum* Wall. is used in the Middle East as a tonic, as well as for the treatment of asthma, bronchitis, urinary tract diseases as diuretic, anti-inflammatory and antispasmodic agents. The leaves of *O. echioides* DC are used as a laxative and the flowers – as a stimulant in the treatment of rheumatism and palpitations [4].

Plants of the genus *Onosma* are also used in composition of officinal drugs, in particular, dry extract of leaves and flowers of *O. bracteatum* have antispasmodic effect and relaxes smooth muscles of internal organs, which is used in the treatment of spasticity of the respiratory system. Extracts from

Применяются растения рода *Onosma* и в официальной медицине, в частности, сухой экстракт листьев и цветков о. прицветковой проявляет спазмолитическое действие и расслабляет гладкие мышцы внутренних органов, что используется при лечении спастических состояний дыхательной системы. Извлечения из травы о. прицветковой используются в комплексной терапии мочекаменной болезни и инфекций мочевыводящих путей [5].

Широкий спектр фармакологических эффектов растений рассматриваемого рода обусловлен особенностями их химического состава, который в настоящее время изучен недостаточно подробно. Так, результаты немногочисленных исследований демонстрируют наличие в сырье сапонинов, жирных кислот, пирролизидиновых алкалоидов, фенольных соединений, а также нафтохинонов, представленных преимущественно шиконином и алканином [6], причем количество данных биологически активных соединений (БАС) существенно отличается в зависимости от вида растения. В частности, по результатам анализа, проведенного методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением масс-спектров (ВЭЖХ-МС), дериваты шиконина и алканина преобладают в экстрактах, полученных из о. синяковидной; другие научные работы демонстрируют, что значительные количества олеиновой и  $\alpha$ -линоленовой кислоты обнаружены в о. прицветковой [7]; сапонины и алкалоиды являются одним из основных компонентов химического состава о. двуцветной, а в некоторых растениях рода присутствуют соединения фенольной природы – производные бензойной кислоты и метилбензоата [6].

В литературных источниках содержится крайне мало информации, касающейся химического состава оносмы простейшей, следовательно, дальнейшее исследование БАС, обнаруживаемых в сырье, в тесной взаимосвязи с оказываемым ими фармакологическим действием позволит значительно расширить область применения растения в медицинской и фармацевтической практике.

## ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Фармакогностическое исследование травы о. простейшей.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служила надземная часть о. простейшей, собранная в фазе цветения в 2023 г. на каменистом склоне реки Шипуниха в

*O. bracteatum* herb are used in the comprehensive therapy of urolithiasis and urinary tract infections [5].

A wide range of pharmacological effects of plants of the genus is due to the peculiarities of their chemical composition, which is currently studied insufficiently. Thus, the results of the numerous studies demonstrate the presence of saponins, fatty acids, pyrrolizidine alkaloids, phenolic compounds, as well as naphthoquinones (mainly shikonin and alkanin) [6], and the amount of these biologically active compounds (BAC) differs significantly depending on a plant species. In particular, according to the results of the high-performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS), derivatives of shikonin and alkanin predominate in extracts obtained from *O. echioides*; other researches show that significant content of oleic and  $\alpha$ -linolenic acids are found in *O. bracteatum* [7]; saponins and alkaloids are the main components of the chemical composition of *O. bicolor*, and some plants of the genus contain phenolic compounds – derivatives of benzoic acid and methylbenzoate [6].

In the literature, information on the chemical composition of *Onosma simplicissima* is limited, therefore, further study of BAC in the raw materials in close relationship with their pharmacological action will allow to significantly expand the use of the plant in medical and pharmaceutical practice.

## AIM OF THE RESEARCH

A pharmacognostic study of *Onosma simplicissima* herb.

## MATERIALS AND METHODS

The object of the study was the aerial part of *O. simplicissima* collected in the flowering phase in 2023 on the rocky slope of the Shipunikha River 1.5 km east of the railway station Lozhok, Iskitimsky district, Novosibirsk region (54°34' N latitude and 83°21' E longitude). The raw materials were cleaned of impurities and damaged parts and brought to an air-dry state under natural conditions.

Qualitative reactions were carried out using water-ethanol extracts using conventional pharmacopoeial methods [8] for the determination of the following groups of BAC: flavonoids, tannins, saponins, polysaccharides, anthocyanins, coumarins. The presence of alkaloids was determined by a series of reactions of raw material extraction using precipitation reagents: Wagner-Bouchard, Dragendorff, Meyer, Marquis, Scheibler, Bertrand,

1.5 км на восток от ж/д станции Ложок Искитимского района Новосибирской области (54°34′ северной широты и 83°21′ восточной долготы). Сырье после заготовки очищали от примесей и поврежденных частей и доводили до воздушно-сухого состояния в естественных условиях.

Качественные реакции проводили с использованием водного и водно-спиртовых извлечений, используя общепринятые фармакопейные методики [8], применяемые для определения следующих групп БАС: флавоноиды, дубильные вещества, сапонины, полисахариды, антоцианы, кумарины. Присутствие алкалоидов определяли проведением серии реакций извлечения из сырья с общеосадительными реактивами: Вагнера – Бушарда, Драгендорфа, Майера, Марки, Шейблера, Бертрана, Зонненштейна, раствором танина и раствором пикриновой кислоты.

Для проведения качественного и количественного анализа состава лекарственного растительного сырья (ЛРС) методом спектрофотометрии использовали суммарные извлечения из сырья. В качестве экстрагента для их получения были выбраны 95 и 70% этанол, 2% водный раствор кислоты хлороводородной (для извлечения алкалоидов) и вода очищенная (для извлечения дубильных веществ и полисахаридов). Точную навеску сырья помещали в колбу, добавляли выбранный экстрагент в соотношении сырье: экстрагент – 1:30, после чего колбы с присоединенным обратным холодильником помещали на кипящую водяную баню и выдерживали в течение 40 минут. После охлаждения извлечения фильтровали и использовали в качестве объектов для анализа на спектрофотометре СФ-56 (ОКБ «Спектр», Россия).

Для исследования флавоноидов по 1 мл извлечения 70% этанолом помещали в две мерные колбы объемом 25 мл и добавляли по 0.3 мл 3% раствора уксусной кислоты. В одну из колб приливали 3 мл 2% раствора алюминия хлорида в 95% этаноле, в результате чего образовывался хромогенный комплекс. Объем в обеих колбах доводили до метки 95% этанолом. В итоге получали исследуемый раствор А (хромогенный комплекс) и раствор сравнения Б. Количественный анализ проводили в 5 повторениях, определяя основные параметры выборки – среднее значение  $\bar{x}$ , стандартное отклонение среднего по выборке  $\sigma$  и доверительный интервал  $\Delta$  по формулам [9]

$$\bar{x} = 1/n \cdot \sum x_i; \sigma = \sqrt{\frac{\sum (\bar{x} - x_i)^2}{n-1}} \text{ и } \Delta = t \cdot \sigma / \sqrt{n},$$

Sonnenschein, tannin solution and picric acid solution.

Total extracts from the raw materials were used for qualitative and quantitative analysis of the composition of medicinal plant materials (MPM) by spectrophotometry. 95% and 70% ethanol, 2% aqueous solution of hydrochloric acid (for alkaloid extraction) and purified water (for tannin and polysaccharide extraction) were used as extractants. An accurately weighed quantity of the raw materials were placed in a flask, the extractant was added to the raw materials at the ratio of 1:30, after which the flasks were heated under reflux for 40 min on a boiling water bath. After cooling, the extracts were filtered and used as objects for analysis on a SF-56 spectrophotometer (OKB Spectr, Russia).

To study flavonoids, 1 ml of 70% ethanol extraction was placed in two 25 ml volumetric flasks and 0.3 ml of a 3% acetic acid solution was added. 3 ml of a 2% aluminum chloride solution in 95% ethanol was poured into one of the flasks, resulting in the formation of a chromogenic complex. The volume in both flasks was diluted to the mark with 95% ethanol. As a result, the studied solution A (chromogenic complex) and the blank solution B were obtained. Quantitative analysis was carried out in 5 repeats, determining the main parameters of the sample – the average value  $\bar{x}$ , the standard deviation of the sample mean  $\sigma$  and the confidence interval  $\Delta$  according to the formulas [9]

$$\bar{x} = 1/n \cdot \sum x_i; \sigma = \sqrt{\frac{\sum (\bar{x} - x_i)^2}{n-1}} \text{ and } \Delta = t \cdot \sigma / \sqrt{n},$$

where  $t = 2.78$  – in the Student's test for the number of degrees of freedom  $f = n - 1 = 4$  and confidence probability  $p = 95\%$ .

In this case, the minimum possible value of the studied indicator is  $x_{\min} = \bar{x} - \Delta$  and the maximum possible  $x_{\max} = \bar{x} + \Delta$ , respectively.

To determine the micromorphological structure of the leaves and flowers, the objects were macerated by boiling for one minute in a 5% aqueous solution of sodium hydroxide (leaves) or in water (corolla). A mixture of water and glycerin at a ratio of 1:1 was used as mounting and clearing liquid. The study was performed using a Zeiss Axio Scope.A1 microscope at magnification  $\times 25-400$  in transmitted light (to reveal structural elements of tissues). The images obtained were captured using a Zeiss AxioCam 512 color digital camera.

где  $t = 2.78$  – критерий Стьюдента при числе степеней свободы  $f = n - 1 = 4$  и доверительной вероятности  $p = 95\%$ .

В этом случае минимально возможное значение исследуемого показателя  $x_{\min} = \bar{x} - \Delta$  и максимально возможное  $x_{\max} = \bar{x} + \Delta$  соответственно.

Для установления микроморфологического строения листьев и цветков проводили предварительное размачивание объектов путем кипячения в течение одной минуты в 5% водном растворе натрия гидроксида (листья) или в воде (венчик). В качестве заключающей и просветляющей жидкости использовали смесь воды и глицерина в соотношении 1:1. Исследование проводили с использованием микроскопа Zeiss Axio Scope.A1 при увеличении в 25–400 раз в проходящем свете (для выявления структурных элементов тканей). Полученные изображения фиксировались с помощью цифровой фотокамеры Zeiss AxioCam 512 color.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Качественный анализ показал наличие в сырье полисахаридов, флавоноидов, полифлавановых соединений (дубильных веществ конденсированной группы – характерное черно-зеленое окрашивание при реакции с железоаммонийными квасцами), фенилпропеновых (оксикоричных) кислот, хлорофилла, каротиноидов. Кроме того, положительный аналитический сигнал был зафиксирован в реакциях извлечения, полученного с использованием в качестве экстрагента 2% хлороводородной кислоты с реактивами Марки, Шейблера, Бертрана и Зонненштейна, что свидетельствует о возможном наличии в сырье алкалоидов.

Анализ длинноволновой части спектра (видимый диапазон 380–780 нм) извлечения 95% этанолом (рис. 1) позволяет сделать вывод о наличии ожидаемых экстремумов, характерных для растительных пигментов – хлорофиллов, каротиноидов и их кислородных производных.

По измеренным значениям оптической плотности при длинах волн 452, 649 и 664 нм можно рассчитать содержание в сырье хлорофиллов а ( $X_a$ ) и б ( $X_b$ ), а также суммы каротиноидов и ксантофилов ( $X_{\text{car}}$ ) (%):

$$X = \frac{C \cdot V_e}{m_c} \cdot \varphi \cdot \frac{100}{100 - w} \cdot 100,$$

где  $C$  – значения концентраций в исследуемых растворах, рассчитываемых по формулам [10, 11]

$$C_a = 13.36 \cdot D_{664} - 5.19 \cdot D_{649};$$

$$C_b = 27.43 \cdot D_{649} - 8.12 \cdot D_{664};$$

## RESULTS AND DISCUSSION

The qualitative analysis showed the presence of polysaccharides, flavonoids, polyflavane compounds (tannins of the condensed group – characteristic black-green staining in reaction with ammonium iron (III) sulfate), phenylpropenic (hydroxy-cinnamic) acids, chlorophyll, carotenoids in the raw materials. In addition, a positive analytical response was recorded for the extracts obtained using 2% hydrochloric acid as an extractant with Marquis, Scheibler, Bertrand and Sonnenschein reagents, which indicates the possible presence of alkaloids in the raw materials.

Analysis of the long-wave part of the spectrum (visible range 380–780 nm) of 95% ethanol extraction (Fig. 1) allows us to conclude that there are expected peaks specific to plant pigments – chlorophylls, carotenoids and their oxygen derivatives.

The measured values of optical density at wavelengths of 452, 649 and 664 nm can be used to calculate the content of chlorophylls a ( $X_a$ ) and b ( $X_b$ ) in raw materials, as well as the sum of carotenoids and xanthophils ( $X_{\text{car}}$ ) (%):

$$X = \frac{C \cdot V_e}{m_{rm}} \cdot \varphi \cdot \frac{100}{100 - w} \cdot 100,$$

where  $C$  – values of concentrations in the studied solutions calculated by the formulas [10, 11]

$$C_a = 13.36 \cdot D_{664} - 5.19 \cdot D_{649};$$

$$C_b = 27.43 \cdot D_{649} - 8.12 \cdot D_{664};$$

$$C_{\text{car}} = 4.75 \cdot D_{452} - 0.226 \cdot (C_a + C_b),$$

where  $D_{452}$ ,  $D_{649}$  и  $D_{664}$  – absorption density values measured at the corresponding wavelengths;

$V_e$  – extractant volume, ml;

$m_{rm}$  – sample weight of raw material, g;

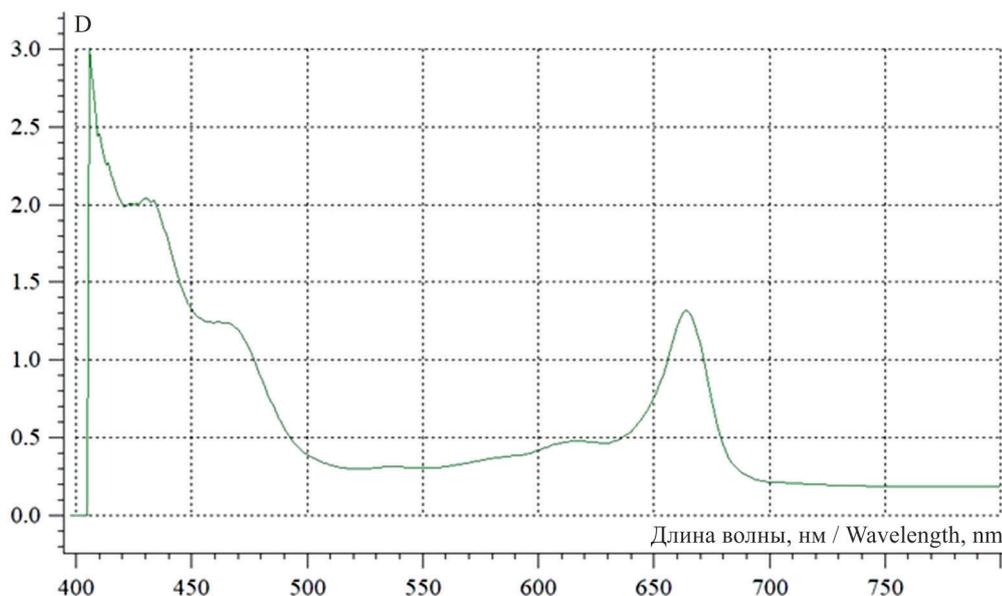
$\varphi$  – dilution factor of extraction during measurement. In the absence of dilution  $\varphi = 1$ ;

$w$  – raw material humidity, %.

The analysis of the ultraviolet spectrum of 70% ethanol extraction from the raw materials showed a bathochromic shift of the absorption maximum characteristic of flavonoids from 360 nm to 407 nm (Fig. 2), which indicates the predominance of rutin in the raw materials, and therefore the flavonoid content was calculated in terms of rutin according to the formula

$$X = \frac{D \cdot V_e}{A_{1\text{cm}}^{1\%} \cdot m_{rm}} \cdot \varphi \cdot \frac{100}{100 - w}, \quad (1)$$

where  $A_{1\text{cm}}^{1\%}$  – the coefficient of percentage extinction (for rutin  $284 \text{ ml} \cdot \%^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  [8]).



**Рис. 1.** Видимый спектр извлечения (9% этанолом) из травы оносмы простейшей  
**Fig. 1.** The visible spectrum of 9% ethanol extraction from *Onosma simplicissima* herb

$$C_{\text{car}} = 4.75 \cdot D_{452} - 0.226 \cdot (C_a + C_b),$$

где  $D_{452}$ ,  $D_{649}$  и  $D_{664}$  – значения плотности поглощения, измеренные на соответствующих длинах волн;

$V_3$  – объем экстрагента, мл;

$m_c$  – масса навески сырья, г;

$\phi$  – фактор разведения извлечения во время измерения. При отсутствии разведения  $\phi = 1$ ;

$w$  – влажность сырья, %.

Анализ ультрафиолетового спектра извлечения из сырья 70% этанолом показал bathochromic сдвиг максимума поглощения, характерный для флавоноидов с 360 до 407 нм (рис. 2), что свидетельствует о преобладании в сырье рутина, и поэтому расчет содержания флавоноидов был произведен в пересчете на рутин по формуле

$$X = \frac{D \cdot V_3}{A_{1\text{cm}}^{1\%} \cdot m_c} \cdot \phi \cdot \frac{100}{100 - w}, \quad (1)$$

где  $A_{1\text{cm}}^{1\%}$  – коэффициент процентной экстинкции (для рутина равный 284  $\text{ml} \cdot \text{\%}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  [8]).

Спектр извлечения из сырья на 70% этаноле без добавления алюминия хлорида (рис. 3) имеет экстремумы, характерные для дикофеилхинной кислоты [12], что позволяет определить ее содержание по измеренной плотности поглощения при длине волны 330 нм по формуле (1) и коэффициенту процентной экстинкции дикофеилхинной кислоты – 659  $\text{ml} \cdot \text{\%}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  [13].

Спектр водного извлечения (рис. 4) имеет максимум поглощения при длине волны 276–

278 нм. Спектр извлечения 70% этанолом из сырья без добавления алюминия хлорида (рис. 3) имеет пики, характерные для дикофеилхинной кислоты [12], что позволяет определить ее содержание по измеренной плотности поглощения на длине волны 330 нм по формуле (1) и коэффициенту процентной экстинкции дикофеилхинной кислоты 659  $\text{ml} \cdot \text{\%}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  [13].

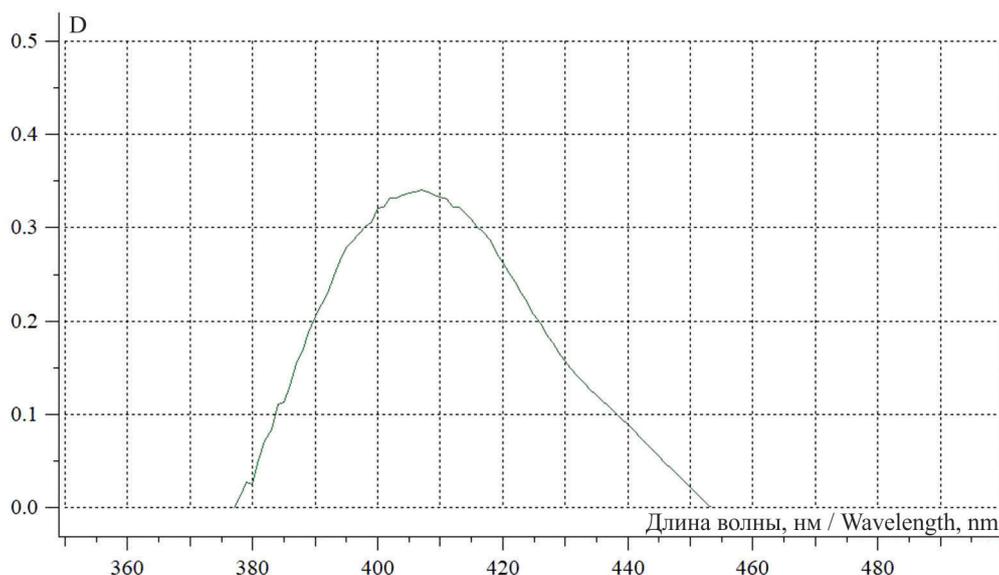
Спектр извлечения водным экстрактом (рис. 4) имеет максимум поглощения на длине волны 276–278 нм и минимум на 250 нм, что типично для катехина [14], и коррелирует с качественной реакцией, показавшей присутствие полифлавоновых соединений (таннинов конденсированной группы), структурной единицей которых является катехин.

Содержание полифлавоновых соединений в терминах катехина было рассчитано на основе оптической плотности, измеренной на длине волны 277 нм, и коэффициента процентной экстинкции катехина 209  $\text{ml} \cdot \text{\%}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  (Таблица 1) [15].

Во время микроскопии было обнаружено, что целое растение опушено; эта особенность типична для всех растений семейства *Boraginaceae*. Опушение представлено тремя типами волос:

1) толстостенный одноклеточный прямой волос длиной до 600  $\mu\text{m}$  и толщиной стенок до 20  $\mu\text{m}$  (рис. 5);

2) капитатный тонкостенный волос с одноклеточным педикелем и одноклеточной сферической головкой (рис. 6);



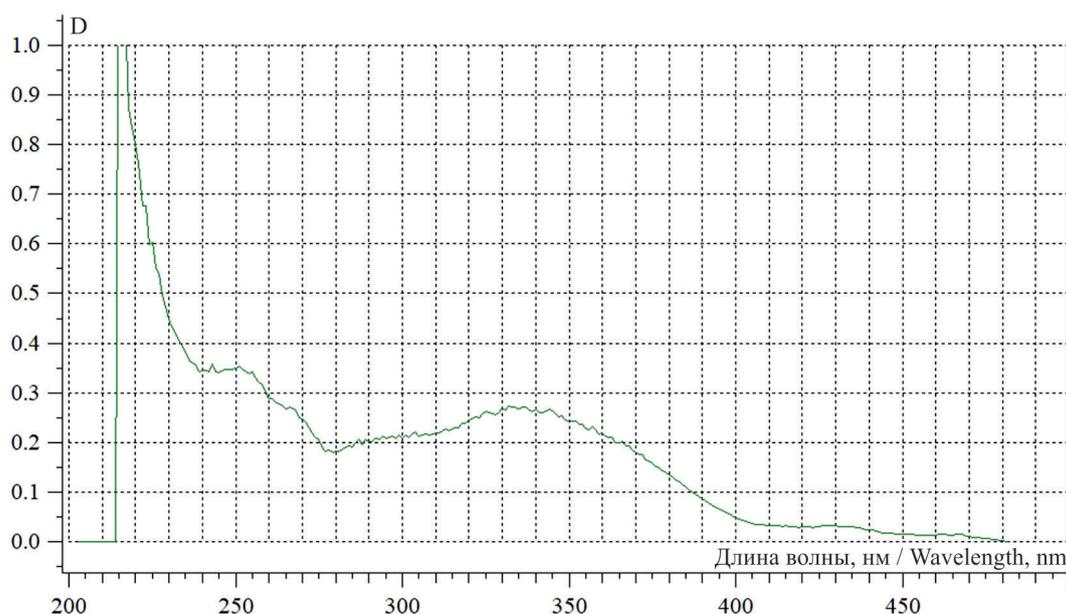
**Рис. 2.** Ультрафиолетовый спектр хромогенного комплекса извлечения из травы оносмы простейшей после реакции с хлоридом алюминия  
**Fig. 2.** The ultraviolet spectrum of the chromogenic complex of extraction from *Onosma simplicissima* herb after aluminum chloride reaction

278 нм и минимум при 250 нм, что характерно для катехина [14], и коррелирует с качественной реакцией, показавшей наличие полифлавановых соединений (дубильных веществ конденсированной группы), структурной единицей которых является катехин.

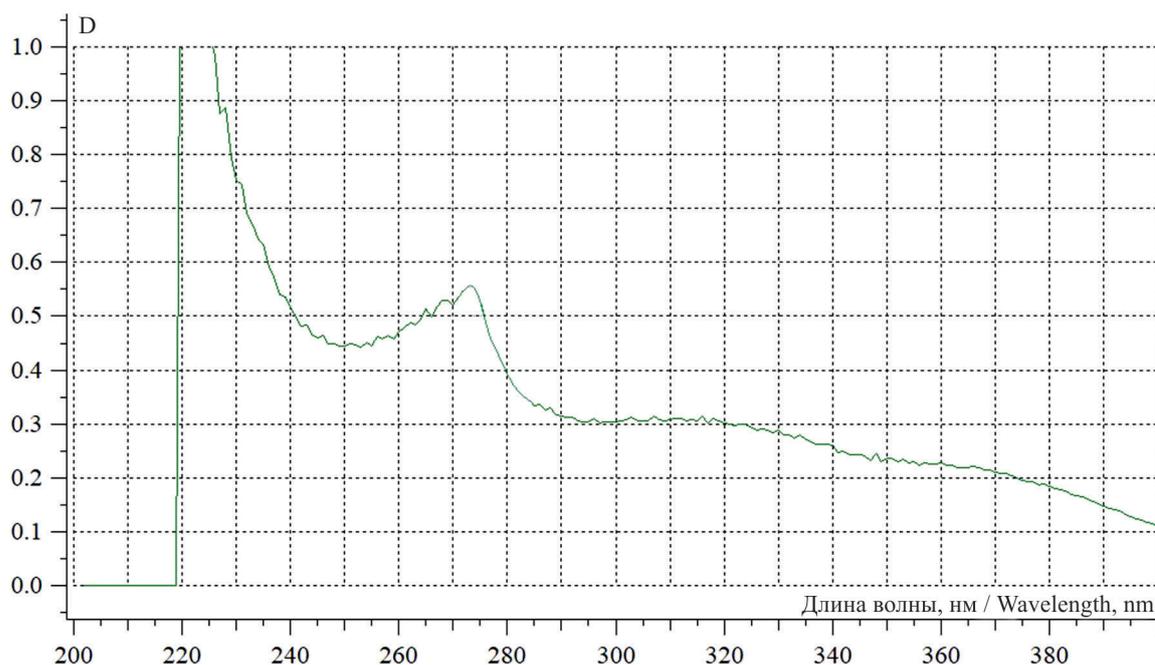
Расчет содержания полифлавановых соединений в пересчете на катехин производили по величине оптической плотности, измеренной при

3) warty single-cell straight hair with a slightly raised pedestal up to 1 mm in length and wall thickness up to 25  $\mu\text{m}$  (Fig. 7).

Epidermis tissue cells of the leaf are slightly sinuated (Fig. 5), the stomata are submerged, form a stomata apparatus of anomocytic type. The petals are characterized by the presence of papillary projections along the edge (Fig. 8) and almost straight-walled epidermal cells.



**Рис. 3.** Ультрафиолетовый спектр извлечения (70% этанол) из травы оносмы простейшей  
**Fig. 3.** The ultraviolet spectrum of 70% ethanol extraction from *Onosma simplicissima* herb



**Рис. 4.** Ультрафиолетовый спектр извлечения (водного) из травы оносмы  
**Fig. 4.** The ultraviolet spectrum of water extraction from *Onosma simplicissima* herb

длине волны 277 нм, и коэффициенту процентной экстинкции катехина –  $209 \text{ мл} \cdot \%^{-1} \cdot \text{г}^{-1}$  (табл. 1) [15].

В результате микроскопического исследования было установлено, что все растение опушено, данный признак является типичным для всех растений семейства *Boraginaceae*. Опушение представлено волосками трех типов:

1) толстостенный одноклеточный прямой волосок длиной до 600 мкм и толщиной стенок до 20 мкм (рис. 5);

## CONCLUSION

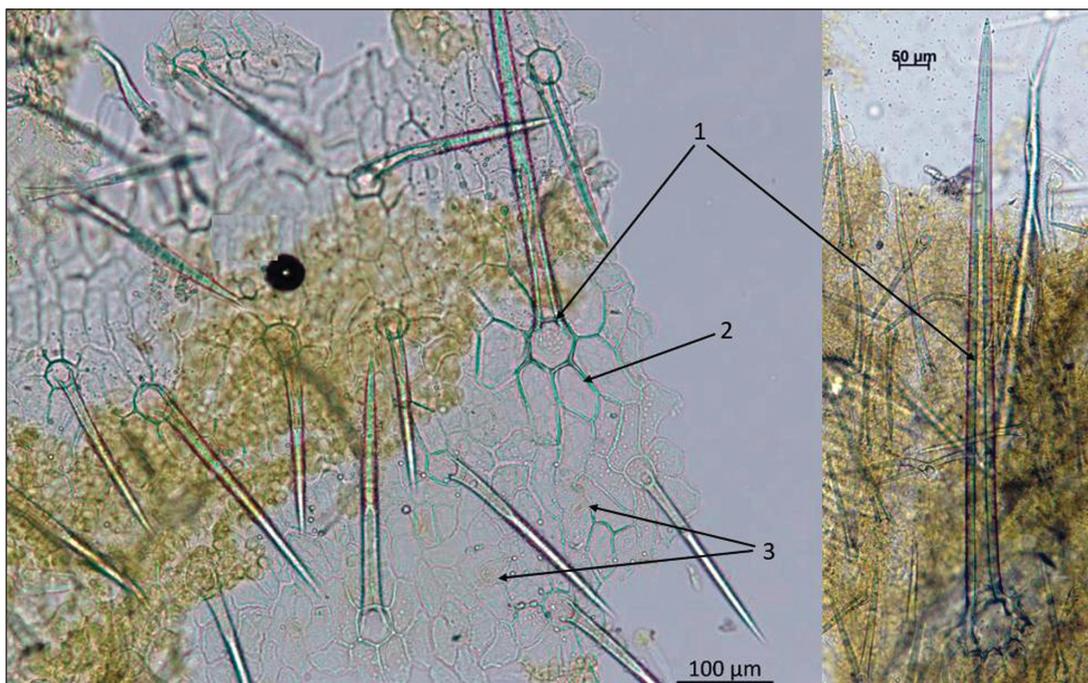
The presence of BAC with anti-inflammatory, bactericidal and regenerative effects was revealed in the composition of *Onosma simplicissima*, which creates prerequisites for an elaborate study of *Onosma simplicissima* as a promising source of MPM.

The possible presence of alkaloids in raw materials requires additional research, as well as the determination of therapeutic and toxic doses of a medicinal herbal preparation based on *Onosma simplicissima* herb.

**Таблица 1.** Содержание в траве оносмы простейшей основных групп биологически активных соединений (% в пересчете на абсолютно сухое сырье)

**Table 1.** Content in *Onosma simplicissima* herb of the main groups of biologically active compounds (% in terms of absolutely dry raw materials)

| №<br>No. | Биологически активные соединения<br>Biologically active compounds   | $\bar{x}$ | $\sigma$ | $x_{\min}$ | $x_{\max}$ |
|----------|---|-----------|----------|------------|------------|
| 1        | Полисахариды / Polysaccharides  | 5.4       | 0.7      | 4.53       | 6.28       |
| 2        | Дубильные вещества (в пересчете на катехин)<br>Tannins (in terms of catechin)   | 3.2       | 0.4      | 2.70       | 3.70       |
| 3        | Хлорофилл а / Chlorophyll a   | 0.46      | 0.06     | 0.39       | 0.54       |
| 4        | Хлорофилл b / Chlorophyll b   | 0.29      | 0.03     | 0.25       | 0.33       |
| 5        | Сумма каротиноидов и ксантофиллов<br>Sum of carotenoids and xanthophylls  | 0.03      | 0.006    | 0.02       | 0.04       |
| 6        | Флавоноиды (в пересчете на рутин)<br>Flavonoids (in terms of rutin)   | 0.98      | 0.015    | 0.96       | 1.00       |
| 7        | Оксикоричные кислоты (в пересчете на дикофеилхинную кислоту)<br>Oxycinnamic acids (in terms of dicaffeoylquinic acid) | 0.34      | 0.04     | 0.29       | 0.39       |



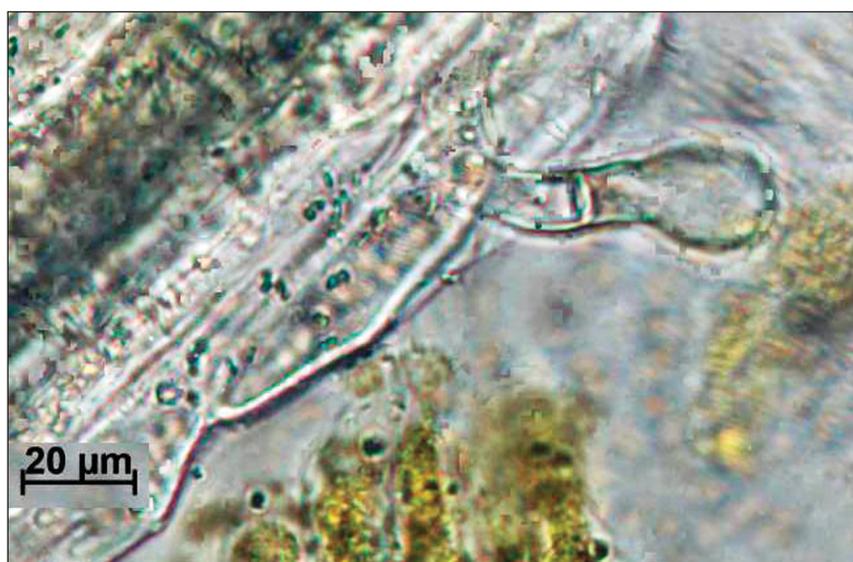
**Рис. 5.** Эпидерма с одноклеточными гладкими толстостенными волосками  
(1 – волосок; 2 – эпидермальные клетки; 3 – устьице)

**Fig. 5.** The epidermis with single-cell smooth thick-walled hairs (1 – hair; 2 – epidermal cells; 3 – stomata)

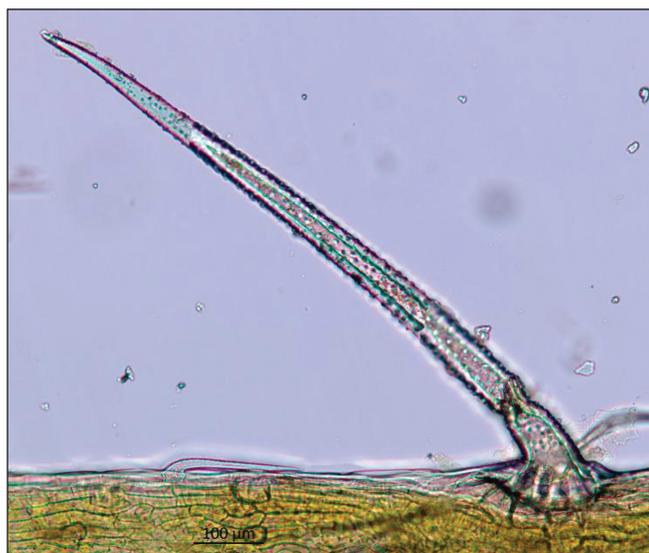
2) головчатый тонкостенный волосок с одноклеточной ножкой и одноклеточной сферической головкой (рис. 6);

3) грубобородавчатый одноклеточный прямой волосок со слегка приподнятым пьедесталом длиной до 1 мм и толщиной стенок до 25 мкм (рис. 7).

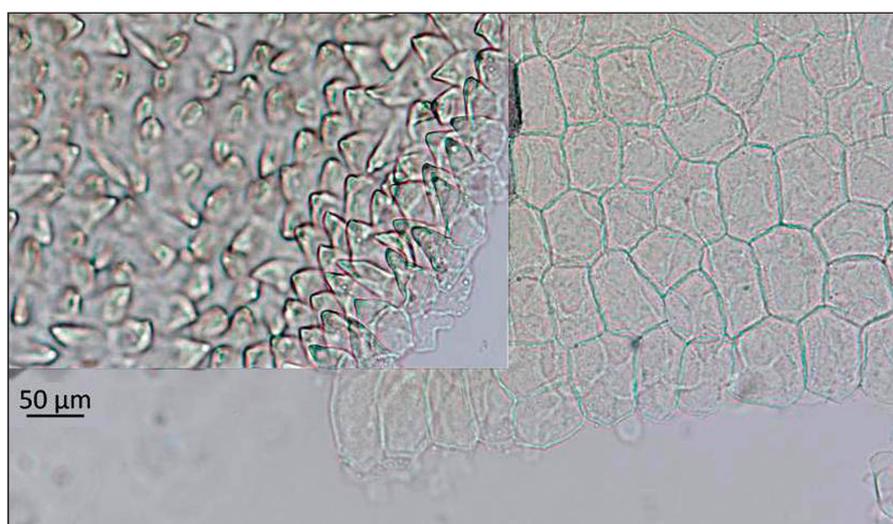
The microscopic analysis allowed us to determine the main microdiagnostic signs of *Onosma simplicissima* leaves and flowers: for the leaf – submerged stomata of anomocytic type and a combination of three types of trichomes; for the petals – the presence of papillary projections along the edge. Microdiagnostic signs are necessary for identification of MPM.



**Рис. 6.** Головчатый волосок  
**Fig. 6.** The capitate hair



**Рис. 7.** Грубобородавчатый волосок  
**Fig. 7.** The warty hair



**Рис. 8.** Сосочковидные выросты и эпидермальные клетки венчика  
**Fig. 8.** Papillary projections and epidermal corolla cells

Клетки эпидермы листа слабоизвилистые (см. рис. 5), устьица погруженные, образуют устьичный аппарат аномоцитного типа. Для лепестков характерно наличие сосочковидных выростов по краю (рис. 8) и почти прямостенных клеток эпидермы.

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

В составе оносмы простейшей установлено наличие БАС, имеющих противовоспалительное, бактерицидное и регенераторное действие, что создает предпосылки для более детального изучения оносмы простейшей в качестве перспек-

**Acknowledgements.** The authors are grateful to the Center for Collective Use of Microscopic Analysis of Biological Objects of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (<http://www.bionet.nsc.ru/microscopy/>) for the equipment provided and to Leading Engineer of the Center – T.E. Alyoshina for assistance when we were working with the equipment.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

тивного лекарственного растения – источника ЛРС.

Возможное наличие алкалоидов в сырье требует дополнительных исследований, а также установления терапевтических и токсических доз лекарственного растительного препарата на основе травы оносмы простейшей.

Микроскопический анализ позволил установить основные микродиагностические признаки листьев и цветков оносмы простейшей: для листа – погруженные устьица аномоцитного типа и сочетание трех типов трихом; для лепестков – наличие сосочковидных выростов по краю.

Микродиагностические признаки необходимы для подтверждения подлинности ЛРС.

**Благодарности.** Авторы благодарны Центру коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН (<http://www.bionet.nsc.ru/microscopy/>) за предоставленное оборудование и ведущему инженеру центра Т.Е. Алешиной за помощь при работе на оборудовании центра.

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

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jabbar A.A., Abdullah F.O., Hassan A.O. et al. Ethnobotanical, phytochemistry, and pharmacological activity of *Onosma* (Boraginaceae): an updated review // *Molecules*. 2022;27(24):8687. DOI: 10.3390/molecules27248687.
2. *Onosma* L. – Оносма // Флора Сибири: в 14 т. / сост. В.М. Доронькин и др. Новосибирск: Наука, 1997. Т. 11: Pyrolaceae – Lamiaceae (Labiatae). С. 106–108.
3. Shilov S.V., Ustenova G.O., Kiyekbayeva L.N. et al. Component composition and biological activity of various extracts of *Onosma gmelinii* (Boraginaceae) // *Int. J. Biomater.* 2022;2022:4427804. DOI: 10.1155/2022/4427804.
4. Binzet R., Akçin Ö.E. The anatomical properties of two *Onosma* L. (Boraginaceae) species from Turkey // *J. Med. Plants Res.* 2012;6(1):3288–3294. DOI: 10.5897/JMPR11.1157.
5. Azarfar A., Rafiee Z., Ravanshad Y. et al. Effect of herbal formulation “Cystone®” on urolithiasis // *Jundishapur J. Nat. Pharm. Prod.* 2020;15(3): e69246. DOI: 10.5812/jjnpp.69246.
6. Özcan T. Characterization of *Onosma bracteosum* Hausskn. and *Onosma thracicum* Velen. based on fatty acid compositions and  $\alpha$ -tocopherol contents of the seed oils // *Eur. J. Biol.* 2009;68(2):75–83.
7. Дайронас Ж.В., Зилфикаров И.Н. Перспективы использования в медицине видов рода *Onosma* (Boraginaceae) // *Растительные ресурсы*. 2012;48(2):293–302.
8. Государственная Фармакопея. XV изд. М., 2023. URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/> (дата обращения: 19.01.2023).
9. Никитин В.И. Первичная статистическая обработка экспериментальных данных. Самара, 2017. 80 с.
10. Санникова Е.Г., Компанцева Е.В., Попова О.И., Айрапетова А.Ю. Определение пигментов в сырье ивы трехтычинковой (*Salix triandra* L.) методами тонкослойной хроматографии и спектрофотометрии // *Химия растительного сырья*. 2019;2:119–127. DOI: 10.14258/jcprm.2019024077.
11. Сушук Н.А., Кисличенко В.С., Кузнецова В.Ю. Изучение хлорофиллов и каротиноидов выжимок плодов *Ribes nigrum* // *Научные ведомости. Серия: Медицина. Фармация*. 2013;25(168):72–74.

### REFERENCES

1. Jabbar A.A., Abdullah F.O., Hassan A.O. et al. Ethnobotanical, phytochemistry, and pharmacological activity of *Onosma* (Boraginaceae): an updated review. *Molecules*. 2022;27(24):8687. DOI: 10.3390/molecules27248687.
2. Doronkin V.M. et al. (1997). *Onosma* L. – *Onosma*. In *Flora of Siberia: in 14 volumes*. Novosibirsk: Nauka. Vol. 1: Pyrolaceae – Lamiaceae (Labiatae). P. 106–108 (In Russ.)
3. Shilov S.V., Ustenova G.O., Kiyekbayeva L.N. et al. Component composition and biological activity of various extracts of *Onosma gmelinii* (Boraginaceae). *Int. J. Biomater.* 2022;2022:4427804. DOI: 10.1155/2022/4427804.
4. Binzet R., Akçin Ö.E. The anatomical properties of two *Onosma* L. (Boraginaceae) species from Turkey. *J. Med. Plants Res.* 2012;6(1):3288–3294. DOI: 10.5897/JMPR11.1157.
5. Azarfar A., Rafiee Z., Ravanshad Y. et al. Effect of herbal formulation “Cystone®” on urolithiasis. *Jundishapur J. Nat. Pharm. Prod.* 2020;15(3): e69246. DOI: 10.5812/jjnpp.69246.
6. Özcan T. Characterization of *Onosma bracteosum* Hausskn. and *Onosma thracicum* Velen. based on fatty acid compositions and  $\alpha$ -tocopherol contents of the seed oils. *Eur. J. Biol.* 2009;68(2):75–83.
7. Daironas J.V., Zilfikarov I.N. Perspectives of medical use of *Onosma* (Boraginaceae) species. *Rastitelnye Resursy*. 2012;48(2):293–302. (In Russ.)
8. *State Pharmacopoeia*. XV ed. (2023). Moscow. URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/> (accessed 19.01.2023).
9. Nikitin V.I. (2017). *Primary Statistical Processing of Experimental Data*. Samara. 80 p. (In Russ.)
10. Sannikova E.G., Kompantseva E.V., Popova O.I., Ayrapetova A.Yu. Determination of pigments in raw materials of *Salix triandra* L. *Chemistry of Plant Raw Materials*. 2019;2:119–127. DOI: 10.14258/jcprm.2019024077. (In Russ.)
11. Sushchuk N.A., Kyslychenko V.S., Kuznetsova V.Yu. Pigments of black currant husks. *Scientific Bulletins. Series: Medicine. Pharmacy*. 2013;25(168):72–74. (In Russ.)
12. Bakchiche B., Gherib A., Bronze M.R., Ghareeb M.A. Identification, quantification, and antioxidant activity

12. Bakchiche B., Gherib A., Bronze M.R., Ghareeb M.A. Identification, quantification, and antioxidant activity of hydroalcoholic extract of *Artemisia campestris* from Algeria // *Turk. J. Pharm. Sci.* 2019;16(2):234-239. DOI: 10.4274/tjps.galenos.2018.99267.
13. Kaeswurm J.A.H., Scharinger A., Teipel J., Buchweitz M. Absorption coefficients of phenolic structures in different solvents routinely used for experiments // *Molecules.* 2021;26(15):4656. DOI: 10.3390/molecules26154656.
14. Li B., Zhang W., Ma H. Physicochemical characterization of inclusion complex of catechin and glucosyl- $\beta$ -cyclodextrin // *Trop. J. Pharm. Res.* 2016;15(1):172. DOI: 10.4314/tjpr.v15i1.23.
15. Справочник биохимика: пер. с англ. / Р. Досон, Д. Эллиот, У. Эллиот, К. Джонс. М., 1991. 544 с.

### СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

**Величко Виктория Владимировна** – канд. фармацевт. наук, заведующий кафедрой фармакогнозии и ботаники ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0002-9224-9350.

**Круглов Дмитрий Семенович** – канд. техн. наук, доцент кафедры фармакогнозии и ботаники ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0002-6027-5730.

**Олешко Егор Данилович** – студент 5-го курса ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия.

- of hydroalcoholic extract of *Artemisia campestris* from Algeria. *Turk. J. Pharm. Sci.* 2019;16(2):234-239. DOI: 10.4274/tjps.galenos.2018.99267.
13. Kaeswurm J.A.H., Scharinger A., Teipel J., Buchweitz M. Absorption coefficients of phenolic structures in different solvents routinely used for experiments. *Molecules.* 2021;26(15):4656. DOI: 10.3390/molecules26154656.
14. Li B., Zhang W., Ma H. Physicochemical characterization of inclusion complex of catechin and glucosyl- $\beta$ -cyclodextrin. *Trop. J. Pharm. Res.* 2016;15(1):172. DOI: 10.4314/tjpr.v15i1.23.
15. Dawson R., Elliott D., Elliott W., K. Jones. (1991). *Biochemist's Handbook: Trans. from Engl. Moscow.* 544 p. (In Russ.)

### ABOUT THE AUTHORS

**Victoria V. Velichko** – Cand. Sci. (Pharmaceut.), Head, Department of Pharmacognosy and Botany, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0002-9224-9350.

**Dmitry S. Kruglov** – Cand. Sci. (Tech.), Associate Professor, Department of Pharmacognosy and Botany, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0002-6027-5730.

**Egor D. Oleshko** – 5th Year Student, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia.

## Динамика маркеров воспалительного ответа при комплексном лечении хронического сальпингоофорита

Е.П. Шатунова<sup>1,2</sup>, Ю.В. Степанова<sup>1,3</sup>, Л.Н. Слатова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Частное учреждение образовательная организация высшего образования Медицинский университет «Реавиз», Самара, Россия

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России, Самара, Россия

<sup>3</sup>ГБУЗ «Самарская городская клиническая больница № 1 им. Н.И. Пирогова», Самара, Россия

### АННОТАЦИЯ

**В в е д е н и е .** Воспалительные заболевания органов малого таза часто сопровождаются развитием хронических тазовых болей, бесплодия и осложнений беременности, поэтому являются актуальной медико-социальной проблемой. В очаге воспаления при хроническом сальпингоофорите (ХСО) развиваются нарушение микроциркуляции и гипоксия тканей. Патогенетически обосновано применение методов лечения, которые способствуют улучшению кровообращения в тканях. Перспективным представляется использование магнито-лазерной терапии, которая оказывает действие за счет инфракрасных лазерных лучей и магнитного поля. Физиотерапевтическое воздействие модулирует стадии иммунного ответа при воспалении, что находит отражение в динамике показателей иммунограммы.

**Ц е л ь .** На основании определения маркеров воспалительного ответа оценить влияние комплексного лечения ХСО с применением физиотерапии.

**М а т е р и а л ы и м е т о д ы .** Оценивались результаты лечения 60 пациенток с обострением хронического сальпингоофорита на основе анализа клинических, лабораторных, иммунологических показателей. Пациентки были разделены на 2 группы: 1-я группа ( $n = 30$ ) – пациентки, в лечение которых кроме лекарственной терапии использовалась физиотерапия; 2-я группа ( $n = 30$ ) – пациентки, получавшие только лекарственную терапию. Лекарственное лечение включало антимикробную терапию цефалоспоридами III поколения в течение 7 сут, нестероидные противовоспалительные и десенсибилизирующие средства. Лечение пациенток из 1-й группы было дополнено курсом из 10 сеансов магнито-лазерной терапии. Определяли уровень интерлейкина-1 $\beta$ , интерлейкина-4 методом иммуноферментного анализа на 1-й и 8-й день от начала заболевания.

**Р е з у л ь т а т ы .** Использование комплексного лечения хронического сальпингоофорита с применением магнито-лазерной терапии приводит к купированию основных клинических проявлений и снижению спонтанных уровней провоспалительных цитокинов в более короткие сроки.

**З а к л ю ч е н и е .** Использование магнито-лазерной терапии в лечении обострения хронического сальпингоофорита сопровождается благоприятным течением воспалительного ответа.

**Ключевые слова:** воспалительные заболевания органов малого таза, хронический сальпингоофорит, цитокины, хроническое воспаление, физиотерапия.

**Образец цитирования:** Шатунова Е.П., Степанова Ю.В., Слатова Л.Н. Динамика маркеров воспалительного ответа при комплексном лечении хронического сальпингоофорита // Journal of Siberian Medical Sciences. 2024;8(3):127-135. DOI: 10.31549/2542-1174-2024-8-3-127-135

Поступила в редакцию 19.03.2024  
Прошла рецензирование 10.04.2024  
Принята к публикации 30.04.2024

Автор, ответственный за переписку  
Слатова Людмила Николаевна: ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России. 443099, г. Самара, ул. Чапаевская, 89.  
E-mail: l.n.slatova@samsmu.ru

Received 19.03.2024  
Revised 10.04.2024  
Accepted 30.04.2024

Corresponding author  
Lyudmila N. Slatova: Samara State Medical University, 89, Chapaevskaya str., Samara, 443099, Russia.  
E-mail: l.n.slatova@samsmu.ru

## Dynamics of inflammatory response markers in comprehensive treatment of chronic salpingo-oophoritis

E.P. Shatunova<sup>1,2</sup>, Yu.V. Stepanova<sup>1,3</sup>, L.N. Slatova<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Medical University "Reaviz", Samara, Russia

<sup>2</sup>Samara State Medical University, Samara, Russia

<sup>3</sup>N.I. Pirogov Samara City Clinical Hospital No. 1, Samara, Russia

### ABSTRACT

**I n t r o d u c t i o n .** Pelvic inflammatory diseases are often accompanied by the development of chronic pelvic pain, infertility and pregnancy complications, therefore they are an important medical and social problem. In the site of inflammation in chronic salpingo-oophoritis (CSO), microcirculation disorders and tissue hypoxia develop. The treatment modalities that improve blood circulation in tissues have a pathogenic basis. The use of magnetic field and laser therapy, which has an effect due to infrared laser radiation and a magnetic field, seems promising. Physiotherapeutic effects modulate the phases of the immune response during inflammation, which is reflected in the dynamics of immunogram indicators.

**A i m .** Based on the determination of the inflammatory response markers, to evaluate the effect of comprehensive treatment of CSO using physiotherapy.

**M a t e r i a l s a n d m e t h o d s .** The treatment results of 60 patients with the exacerbation of CSO were assessed based on the analysis of clinical, laboratory and immunological parameters. The patients were divided into 2 groups: group 1 ( $n = 30$ ) included women who received pharmacologic treatment and physiotherapy; group 2 ( $n = 30$ ) included patients who received pharmacologic treatment alone. The pharmacologic treatment included antimicrobial therapy with third-generation cephalosporins for 7 days, nonsteroidal anti-inflammatory and antiallergic agents. The treatment of patients in group 1 was supplemented by a course of 10 sessions of magnetic field and laser therapy. The levels of interleukin-1 $\beta$  and interleukin-4 were determined by enzyme immunoassay on the 1st and 8th days from the disease onset.

**R e s u l t s .** The comprehensive treatment of CSO with the use of magnetic field and laser therapy leads to the relief of the main clinical manifestations and a decrease in spontaneous levels of pro-inflammatory cytokines in a shorter time.

**C o n c l u s i o n .** The use of magnetic field and laser therapy in the treatment of the CSO exacerbation is accompanied by a favorable course of the inflammatory response.

**Keywords:** pelvic inflammatory diseases, chronic salpingo-oophoritis, cytokines, chronic inflammation, physiotherapy.

**Citation example:** Shatunova E.P., Stepanova Yu.V., Slatova L.N. Dynamics of inflammatory response markers in comprehensive treatment of chronic salpingo-oophoritis. *Journal of Siberian Medical Sciences*. 2024;8(3):127-135. DOI: 10.31549/2542-1174-2024-8-3-127-135

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время воспалительные заболевания органов малого таза (ВЗОМТ) являются актуальной медико-социальной проблемой, и наибольший удельный вес в этой группе имеет хроническое воспаление придатков матки. Нередко вызванные им заболевания сопровождаются развитием хронических тазовых болей, бесплодия и внематочной беременности [1, 2]. Влияние хронического сальпингоофорита (ХСО) на репродуктивную функцию подтверждается высокой частотой осложнений беременности, о чем свидетельствуют данные литературы [2].

Согласно современным представлениям течение и исходы воспалительного процесса являются отражением особенностей функционирования

### INTRODUCTION

Currently, pelvic inflammatory diseases (PID) are an urgent medical and social problem, and chronic inflammation in the uterine adnexa accounts for the largest ratio in this group. Often, the diseases caused by it are accompanied by the development of chronic pelvic pain, infertility and ectopic pregnancy [1, 2]. The impact of chronic salpingo-oophoritis (CSO) on reproductive function is confirmed by the high frequency of pregnancy complications, as evidenced by the literature data [2].

According to modern concepts, the course and outcomes of inflammatory processes are a reflection of the peculiarities of the immune system functioning [3]. The levels of biologically active substances during inflammation vary depending on the phase of inflam-

ния иммунной системы [3]. Уровни биологически активных веществ при воспалении различаются в зависимости от этапа воспалительного ответа. При воздействии определенных экзо- и эндогенных факторов некоторые стадии иммунного ответа усиливаются и растягиваются во времени, другие, наоборот, могут сокращаться вплоть до полного исчезновения, что находит отражение в динамике показателей иммунограммы [4–6].

В любом очаге воспаления, и при ХСО в том числе, отмечаются нарушение микроциркуляции и кровотока, гипоксия тканей [7, 8]. Поэтому патогенетически обосновано применение методов лечения, которые способствуют улучшению кровообращения в тканях. С этих позиций назначение пациенткам магнито-лазерной терапии (МЛТ), использующей воздействие инфракрасных лазерных лучей и магнитного поля в качестве лечебных факторов, представляется перспективным. Вазодилаторный и дезагрегационный эффекты МЛТ реализуются в основном на микроциркуляторном уровне, мало затрагивая системный кровоток. Таким образом, биологические эффекты МЛТ сводятся к согласованию трех основных параметров гомеостаза: микроциркуляции, вазодилатации, дезагрегации.

В настоящее время патогенетическое обоснование лечебных вмешательств является важным для коррекции схемы лечения и служит цели улучшения прогноза пациенток с ХСО. Так, интерес представляет динамика маркеров воспаления, отражающих активность воспалительно-репаративных процессов у пациенток с ХСО на фоне физиотерапевтических воздействий [2, 6, 7]. Большая значимость изложенных вопросов для улучшения течения и снижения числа осложнений при ХСО обуславливает актуальность данного исследования.

## ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

На основании определения маркеров воспалительного ответа оценить результаты комплексного лечения ХСО с применением МЛТ.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании приняли участие 60 женщин с обострением ХСО, которые находились на стационарном лечении в Самарской городской клинической больнице № 1 им. Н.И. Пирогова. Все больные подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Женщины были разделены на 2 группы в зависимости от метода лечения:

matory response. When exposed to certain exogenous and endogenous factors, some phases of the immune response are enhanced and extended in time, while others, on the contrary, can be reduced to the point of complete disappearance, which is reflected in the dynamics of the immunogram indicators [4–6].

In any inflammation site, including CSO, microcirculatory disorders and alteration in blood flow, tissue hypoxia are observed [7, 8]. Therefore, the use of treatment modalities that improve blood circulation in tissues has a pathogenetic basis. In that context, assigning magnetic field and laser therapy (MLT) to patients, using the effects of infrared laser radiation and a magnetic field as therapeutic factors, seems promising. The vasodilatory and disaggregation effects of MLT are realized mainly at the microcirculatory level, with a little influence on systemic blood flow. Thus, the biological effects of MLT are reduced to the coordination of three main parameters of homeostasis: microcirculation, vasodilation, disaggregation.

Currently, the pathogenetic basis of therapeutic interventions is important for correcting the treatment regimen and serves the purpose of improving the prognosis of patients with CSO. Thus, the dynamics of inflammation markers reflecting the activity of inflammatory-reparative processes in patients with CSO during physiotherapeutic interventions is of interest [2, 6, 7]. The great importance of the above-mentioned issues for improving the course and reducing the number of complications in CSO determines the relevance of this study.

## AIM OF THE RESEARCH

Based on the determination of the inflammatory response markers, to evaluate the results of the comprehensive treatment of CSO using MLT.

## MATERIALS AND METHODS

The study involved 60 women with the CSO exacerbation who were undergoing inpatient treatment at the N.I. Pirogov Samara City Clinical Hospital No. 1. All patients provided informed consent to participate in the study.

Women were divided into 2 groups depending on the treatment regimen:

group 1, main group ( $n = 30$ ) – patients with CSO, in whose treatment, in addition to pharmacotherapy, MLT was used.

group 2, comparison one ( $n = 30$ ) – patients with CSO, who received pharmacotherapy alone.

The inclusion criteria were: moderate pelvic pain and tenderness on examination in the uterine adnexa region, an increase in body temperature up to 37.9°C,

1-я группа, основная ( $n = 30$ ) – пациентки с ХСО, в лечении которых кроме медикаментозной терапии использовалась МЛТ.

2-я группа, сравнения ( $n = 30$ ) – пациентки с ХСО, которые получали только медикаментозное лечение.

Критериями включения были умеренные тазовые боли и болезненность при осмотре в области придатков матки, повышение температуры тела до  $37.9\text{ }^{\circ}\text{C}$ , положительный С-реактивный белок (СРБ), лейкоцитоз крови не выше  $13.0 \times 10^9/\text{л}$ . Критериями исключения явились пельвиоперитонит, наличие тяжелых экстрагенитальных заболеваний.

В ходе исследования изучался анамнез заболевания, проводились гинекологический осмотр, общеклиническое лабораторное исследование, ультразвуковое исследование органов малого таза, иммуноферментный анализ.

Для определения содержания провоспалительного интерлейкина- $1\beta$  (ИЛ- $1\beta$ ) и противовоспалительного интерлейкина-4 (ИЛ-4) использовали метод иммуноферментного анализа с применением тест-систем ЗАО «Вектор-Бест» (Россия). Забор крови проводили на 1-е и 8-е сутки лечения.

Комплексное лечение всех больных с ХСО было проведено в соответствии с действующими клиническими рекомендациями и протоколами оказания медицинской помощи и включало в себя антибактериальную терапию цефалоспоридами III поколения, нестероидные противовоспалительные и десенсибилизирующие средства [9]. Пациенткам из первой группы проводился курс МЛТ с использованием аппарата МИЛТА Ф-8 (ЗАО «НПО Космического приборостроения», Москва), включающий 10 сеансов по абдоминальной или вагинальной методике по 10 мин, всего 10 процедур.

Статистическая обработка полученных результатов выполнена с применением программ STATISTICA 10.0 и Excel 2007. Количественные данные с нормальным распределением представлены в виде среднего (M) и среднеквадратичного отклонения (SD), качественные признаки – в виде абсолютных и относительных частот. Сравнение групп проводили с помощью параметрических и непараметрических методов статистики, статистически значимыми считали различия при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

При анализе клинико-anamnestических данных распределение по возрасту было следующим: в первой группе  $25.9 \pm 0.1$  года, во второй группе –

elevated C-reactive protein (CRP), and leukocytosis  $\leq 13.0 \times 10^9/\text{л}$ . The exclusion criteria were: pelvic peritonitis and severe extragenital diseases.

During the study, a history of the disease was analyzed, a gynecological examination, clinical lab tests, pelvic ultrasound, and enzyme immunoassay were performed.

To determine the content of pro-inflammatory interleukin- $1\beta$  (IL- $1\beta$ ) and anti-inflammatory interleukin-4 (IL-4), the enzyme immunoassay method was used with test systems of Vector-Best CJSC (Russia). Blood sampling was conducted on the 1st and 8th days of treatment.

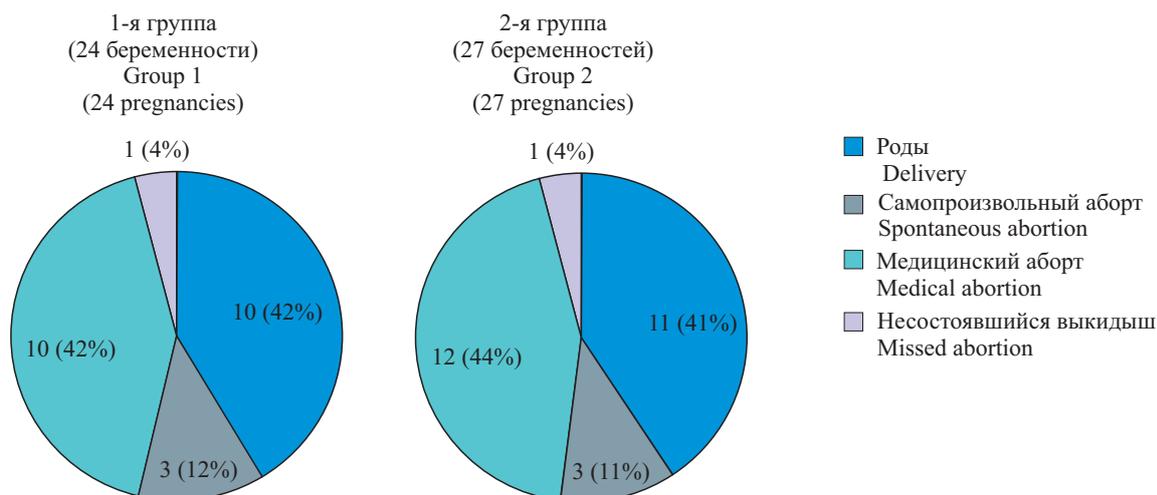
The comprehensive treatment of all patients with chronic salpingo-oophoritis was carried out in accordance with current clinical guidelines and protocols for the provision of medical care and included antibacterial therapy with third-generation cephalosporins, non-steroidal anti-inflammatory drugs, and antiallergic agents [9]. Patients from the first group received a course of MLT using a MILTA F-8 device (NPO Kosmicheskogo Priborostroeniya CJSC, Moscow), including 10 sessions by the abdominal or vaginal technique for 10 min, a total of 10 procedures.

Statistical processing of the results was performed using STATISTICA 10.0 and Excel 2007. Quantitative data with the normal distribution are presented as mean (M) and standard deviation (SD), qualitative features – as absolute and relative values. Comparison between groups was performed using parametric and non-parametric statistical methods, differences were considered statistically significant at  $p < 0.05$ .

## RESULTS

The analysis of clinical and anamnestic data showed the following age distribution: in the first group  $25.9 \pm 0.1$  years, in the second group  $26.2 \pm 0.3$  years ( $p > 0.05$ ). According to the reproductive history, there were 0.8 pregnancies per woman in the first group, in the second group 0.9 pregnancies. According to the structure of pregnancy outcomes, the groups did not differ (Fig. 1). At the same time, pregnancies in the first group ended with childbirth in 10 cases, in the second group – in 11 cases ( $p > 0.05$ ); with spontaneous abortion – in 3 cases in each group ( $p > 0.05$ ); medical abortion – in 10 and 12 cases, respectively ( $p > 0.05$ ); missed abortion – 1 case each group, respectively ( $p > 0.05$ ).

When analyzing the structure of gynecological morbidity, all patients had one episode of the exacerbation of CSO or more in a history: in 21 (35%) cases – non-specific vulvovaginitis, in 11 (18.3%) cases – vulvovaginal candidiasis. Statistically significant differences were not revealed between groups.



**Рис. 1.** Исходы беременностей в группах по данным анамнеза  
**Fig. 1.** Pregnancy outcomes in groups according to the anamnestic data

26.2 ± 0.3 года ( $p > 0.05$ ). В акушерском анамнезе в первой группе на каждую женщину приходилось 0.8 беременностей, во второй группе – 0.9 беременностей. По структуре исходов беременностей в анамнезе группы не различались (рис. 1). При этом беременности в первой группе закончились родами в 10 случаях, во второй группе – в 11 случаях ( $p > 0.05$ ); самопроизвольным абортom – в 3 случаях в каждой группе ( $p > 0.05$ ); медицинским абортom – в 10 и 12 случаях соответственно ( $p > 0.05$ ); несостоявшимся выкидышем – по 1 случаю соответственно ( $p > 0.05$ ).

При анализе структуры гинекологической заболеваемости у всех больных в анамнезе был отмечен один эпизод обострения ХСО и более, в 21 (35 %) случае – неспецифический вульвовагинит, в 11 (18.3 %) случаях – генитальный кандидоз. Статистически значимых различий в группах не выявлено.

Клиническая оценка показала, что болевой синдром у женщин первой группы купировался на 3–4 дня раньше по сравнению со второй группой. Абсолютное отсутствие болей на фоне проведения комплексной терапии пациентки основной группы отметили к 6.1 ± 0.7 сут лечения, в группе сравнения – к 9.2 ± 0.8 суткам ( $p < 0.05$ ).

Пациентки основной группы также указали на улучшение сна, нормализацию температуры на 2–3 дня раньше, чем пациентки группы сравнения.

Изменения лабораторных показателей у пациенток на фоне лечения представлены в табл. 1. Анализ лейкоцитарной формулы показал, что в 1-е сутки у пациенток обеих групп наблюдался умеренный лейкоцитоз, не достигая значимых отличий между группами. После лече-

Clinical examination showed that pain syndrome in women of the first group was relieved 3–4 days earlier compared to the second group. The absence of pain syndrome during the comprehensive therapy was in patients of the main group by 6.1 ± 0.7 days of treatment, in the comparison group – by 9.2 ± 0.8 days ( $p < 0.05$ ).

Patients in the main group also indicated sleep quality improvement and defervescence 2–3 days earlier than in patients of the comparison group.

Changes in laboratory parameters in patients during the treatment are presented in Table 1. The analysis of the white blood cell differential showed that on the 1st day, patients in both groups had moderate leukocytosis, without significant differences between the groups. After the treatment, both groups showed a decrease in leukocytosis and normalization of the neutrophil granulocyte count, with no statistically significant differences between the groups. Similar dynamics were revealed when studying biochemical markers of inflammation. Thus, at baseline, there was an increase in the erythrocyte sedimentation rate (ESR), fibrinogen, and CRP values in each group of patients. During the treatment, the greatest dynamics of the decrease in these markers was in the first group with MLT use: a decrease in ESR by 68% ( $p < 0.05$ ), CRP – by 68% ( $p < 0.05$ ), fibrinogen – by 30.4%. When determining the concentration of pro- and anti-inflammatory cytokines, it was found that the exacerbation of CSO is accompanied by an increase in the level of pro-inflammatory IL-1β on the first day of hospitalization, while during the treatment it decreases ( $p < 0.001$  and  $p < 0.05$  for groups 1 and 2, respectively).

To assess the prevalence of pro- or anti-inflammatory processes, we determined the ratio of IL-4 to

ния в обеих группах в лейкоцитарной формуле наблюдалось уменьшение лейкоцитоза и нормализация числа палочкоядерных лейкоцитов с отсутствием статистически значимых различий между группами. Схожая динамика была выявлена при изучении биохимических маркеров воспаления. Так, исходно наблюдалось повышение скорости оседания эритроцитов (СОЭ), уровня фибриногена и СРБ в каждой группе пациенток. На фоне лечения наибольшая динамика по снижению данных маркеров отмечалась в первой группе с применением МЛТ: уменьшение СОЭ на 68 % ( $p < 0.05$ ), СРБ – на 68 % ( $p < 0.05$ ), фибриногена – на 30.4 %. При определении концентрации про- и противовоспалительных цитокинов было выявлено, что обострение ХСО сопровождается повышением уровня провоспалительного ИЛ-1 $\beta$  в первые сутки госпитализации, а на фоне лечения он снижается ( $p < 0.001$  и  $p < 0.05$  для 1-й и 2-й групп соответственно).

Для суждения о преобладании про- или противовоспалительных процессов мы определяли отношение уровня ИЛ-4 к уровню ИЛ-1 $\beta$ . До проведения терапии у пациенток обеих групп преобладал провоспалительный медиатор. После лечения мы отметили различное соотношение в балансе этих молекул. У женщин 1-й группы преобладал противовоспалительный цитокин, и отношение ИЛ-4 к ИЛ-1 $\beta$  оказалось в 1.55 раза больше, чем во 2-й группе ( $p < 0.05$ ).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Адекватное и своевременное лечение воспалительных заболеваний органов малого таза у женщин имеет важное значение в сохранении фертильности, наступлении беременности и предотвращении гестационных осложнений в дальнейшем [10, 11]. Поскольку воспалительный ответ является ключевым звеном патогенеза ХСО, представляет интерес изучение динамики маркеров воспаления при применении медикаментозных и немедикаментозных методов лечения. В качестве маркеров воспаления в первую очередь выступают белки острой фазы, такие как СРБ, фибриноген и медиаторы воспаления – цитокины. СРБ вырабатывается преимущественно гепатоцитами и является одним из наиболее высокочувствительных показателей повреждения тканей при воспалении. Фибриноген является белком острой фазы воспаления.

Известно, что в основе любого воспалительного процесса лежит запуск каскада цитокиновых взаимодействий. Активация иммунных клеток и усиление продукции провоспалитель-

ИЛ-1 $\beta$ . At baseline, the pro-inflammatory molecule prevailed in patients of both groups. After the treatment, a various ratio in the balance of these molecules was registered. In women of the first group, the anti-inflammatory cytokine prevailed, and the ratio of IL-4 to IL-1 $\beta$  was 1.55 times higher than in the second group ( $p < 0.05$ ).

## DISCUSSION

Adequate and timely treatment of female pelvic inflammatory diseases is important for maintaining fertility, becoming pregnant and preventing gestational complications in the future [10, 11]. Since the inflammatory response is a key link in the pathogenesis of CSO, it is of interest to study the dynamics of inflammation markers when using pharmacological and non-pharmacological treatment. Acute phase proteins such as CRP, fibrinogen and mediators of inflammation – cytokines act primarily as inflammation markers. CRP is produced primarily by hepatocytes and is one of the high-sensitive markers of tissue damage during inflammation. Fibrinogen is a protein of acute phase of inflammation.

It is known that any inflammatory process is based on the triggering a cascade of cytokine interactions. Activation of immune cells and overproduction of pro-inflammatory cytokines are necessary at the onset of inflammation. Thus, overexpression of the pro-inflammatory cytokine IL-1 $\beta$  is observed in many chronic diseases of the pelvic organs, but the regulation of the inflammatory process requires the production of anti-inflammatory cytokines, including IL-4, which is promoted by activated type 2 T-helpers [12]. Further production of pro-inflammatory cytokines can play a destructive role and leads to adverse effects. Some authors suggest the role of pro-inflammatory cytokines in the progression of tissue adhesion in the course of PID, which serves as the basis for the development of complications of CSO [13].

Considering the importance of the inflammatory response in the pathogenesis of CSO, it is of interest to study the dynamics of inflammation markers during pharmacological and non-pharmacological treatment.

The positive effect of MLT is based on the penetrating ability of radiation. Improved tissue perfusion occurs due to the vasodilatory effect caused by an increase in the diameter of arterioles and venules, normalization of thrombus formation and fibrinolysis [14]. This leads to the improvement of microcirculation at the inflammatory site and desensitization and, as a consequence, to a decrease in exudation and edema. Such a decrease in the severity of the inflammatory response can explain the subjective reduction in symptoms (pain syndrome) in patients

**Таблица 1.** Динамика лабораторных показателей у пациенток с хроническим сальпингоофоритом  
**Table 1.** Dynamics of laboratory parameters in patients with chronic salpingo-oophoritis

| Показатель<br>Parameter   | 1-я группа (основная)<br>Group 1 (main)<br>n = 30 |                                      | 2-я группа (сравнения)<br>Group 2 (comparison)<br>n = 30 |                                      | P <sub>1-2</sub> | P <sub>3-4</sub> |
|---|---|--------------------------------------|--|--------------------------------------|------------------|------------------|
|   | 1   | 2                                    | 3  | 4                                    |                  |                  |
|   | до лечения<br>baseline                            | после лечения<br>after the treatment | до лечения<br>baseline                                   | после лечения<br>after the treatment |                  |                  |
| Лейкоциты (10 <sup>9</sup> /л)<br>Leukocytes (10 <sup>9</sup> /l) | 12.8 ± 24   | 6.2 ± 0.8                            | 12.6 ± 2.3   | 8.1 ± 0.7                            | 0.01             | >0.05            |
| Нейтрофилы<br>палочкоядерные (%)<br>Neutrophil granulocytes (%)   | 9.4 ± 1.3   | 5.4 ± 0.4                            | 9.3 ± 1.7  | 6.1 ± 0.7                            | <0.01            | >0.05            |
| СОЭ (мм/ч) / ESR (mm/h)   | 33.1 ± 4.2  | 10.4 ± 0.9*                          | 32.6 ± 4.1   | 18.1 ± 2.4*                          | <0.01            | <0.01            |
| Фибриноген (г/л)<br>Fibrinogen (g/l)                              | 4.6 ± 0.4   | 3.2 ± 0.3                            | 4.5 ± 0.3  | 3.6 ± 0.4                            | <0.01            | >0.05            |
| СРБ, мг/л   CRP, mg/l   | 22.1 ± 2.6  | 6.1 ± 0.7*                           | 20.1 ± 2.1   | 12.1 ± 1.5*                          | <0.01            | <0.01            |
| ИЛ-1β, пг/мл   IL-1β, pg/ml                                       | 29.7 ± 4.8  | 8.7 ± 1.2*                           | 26.7 ± 4.6   | 14.3 ± 1.3*                          | <0.001           | <0.05            |
| ИЛ-4, пг/мл   IL-4, pg/ml   | 5.9 ± 1.3   | 11.8 ± 1.4*                          | 5.3 ± 1.1  | 7.4 ± 0.9*                           | <0.01            | >0.05            |
| ИЛ-4/ИЛ-1β   IL-4/IL-1β   | 0.19 ± 0.06                                       | 1.29 ± 0.11*                         | 0.19 ± 0.04  | 0.83 ± 0.13*                         | <0.001           | <0.001           |

П р и м е ч а н и я : СОЭ – скорость оседания эритроцитов; СРБ – С-реактивный белок; ИЛ – интерлейкин.

\* Межгрупповые различия между 1-й и 2-й группами до или после лечения при  $p < 0.05$ .

N o t e s : ESR – erythrocyte sedimentation rate; CRP – C-reactive protein; IL – interleukin.

\* Differences between groups 1 and 2 at baseline or after the treatment in  $p < 0.05$ .

ных цитокинов необходимы в дебюте воспаления. Так, сверхэкспрессия провоспалительного цитокина ИЛ-1β наблюдается при многих хронических заболеваниях органов малого таза, однако для регуляции воспалительного процесса необходим синтез противовоспалительных цитокинов, в том числе ИЛ-4, который продуцируется активированными Т-хелперами 2-го типа [12]. Дальнейшая продукция провоспалительных цитокинов может играть деструктивную роль и приводит к неблагоприятным эффектам. Некоторыми авторами предполагается роль провоспалительных цитокинов в прогрессировании адгезии тканей при развитии ВЗОМТ, что служит основой для развития осложнений ХСО [13].

Учитывая важное значение воспалительного ответа в патогенезе ХСО, представляет интерес изучение динамики маркеров воспаления при применении медикаментозных и немедикаментозных методов лечения.

В основе положительного действия МЛТ лежит проникающая способность излучения. Улучшение перфузии тканей происходит благодаря сосудорасширяющему эффекту за счет увеличения диаметра артериол и венул, нормализации процессов тромбообразования и фибринолиза [14]. Это приводит к нормализации микроциркуляции в очаге воспаления и десенсибилизирующему эффекту и, как следствие, к уменьше-

ния концентрации цитокинов у пациенток 1-й группы, получавшей МЛТ в дополнение к фармакологическому лечению.

Использование МЛТ в комплексной терапии ХСО сопровождалось снижением концентрации ИЛ-1β в 3.4 раза, лейкоцитов – в 2 раза, С-реактивного белка – в 3.6 раза, фибриногена – в 1.4 раза, а также СОЭ – в 3.2 раза в основной группе по сравнению с группой сравнения. При изучении соотношения цитокинов в развитии воспалительного ответа в ХСО, относительное увеличение концентрации ИЛ-4 после лечения было выявлено в обеих группах. Это указывает на замедление воспалительного процесса, поскольку эффект ИЛ-4 связан с подавлением воспалительного ответа и ингибированием высвобождения фактора некроза опухоли-α и ИЛ-1β. Значительное увеличение соотношения ИЛ-4 / ИЛ-1β в группе 1 по сравнению с группой 2 также подтверждает благоприятный ход местного воспалительного ответа при фармакологическом лечении с добавлением МЛТ.

## CONCLUSION

According to the results obtained, MLT has a multicomponent and pathogenetic effect in CSO.

Determination of the cytokine levels before and after the treatment of patients with CSO allowed us to evaluate the dynamics of the inflammatory process in CSO patients treated with MLT. The use of MLT in the treatment of the CSO exacerbation leads to a decrease in spontaneous production of IL-1β and

нию экссудации и отека. Подобным снижением выраженности воспалительной реакции можно объяснить субъективное уменьшение симптомов (болевого синдрома) у пациенток 1-й группы на фоне проведения МЛТ в дополнение к медикаментозному лечению.

Использование МЛТ в комплексной терапии ХСО сопровождалось снижением концентрации ИЛ-1 $\beta$  в 3.4 раза, СОЭ в 3.2 раза, лейкоцитоза в 2 раза, С-реактивного белка в 3.6 раза, фибриногена в 1.4 раза в основной группе относительно группы сравнения. При изучении соотношения цитокинов в процессе формирования воспалительной реакции при ХСО было выявлено относительное увеличение концентрации ИЛ-4 после лечения в каждой группе. Это свидетельствует о стихании воспалительного процесса, поскольку действие ИЛ-4 связано с подавлением воспалительной реакции и ингибированием высвобождения фактора некроза опухоли- $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$ . Значимое увеличение отношения ИЛ-4/ИЛ-1 $\beta$  в 1-й группе по сравнению со 2-й группой также подтверждает благоприятное течение локального воспалительного ответа на фоне добавления МЛТ к медикаментозной терапии.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Savaris R.F., Fuhrich D.G., Maissiat J. et al. Antibiotic therapy for pelvic inflammatory disease // *Cochrane Database Syst. Rev.* 2020;8(8):CD010285. DOI: 10.1002/14651858.CD010285.pub3.
2. Селихова М.С., Солтыс П.А. Современные акценты в диагностике воспалительных заболеваний органов малого таза // *Архив акушерства и гинекологии им В.Ф. Снегирева.* 2020;1(7):37-42. DOI: 10.18821/2313-8726-2020-7-1-37-42.
3. Шатунова Е.П., Федорина Т.А., Линева О.И., Кузнецова Л.В. Клинические и патоморфологические особенности у больных с гнойными воспалительными образованиями придатков матки // *Акушерство и гинекология.* 2021;(10):118-124. DOI 10.18565/aig.2021.10.118-124.
4. Ravel J., Moreno I., Simón C. Bacterial vaginosis and its association with infertility, endometritis, and pelvic inflammatory disease // *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2021;224(3):251-257. DOI: 10.1016/j.ajog.2020.10.019.
5. Белякова И.А., Никифорова О.Ю., Уразова О.И. и др. Динамика цитокинового профиля у детей и подростков с туберкулезом внутригрудных лимфатических узлов при курсовой терапии модулированным инфракрасным полем // *Journal of Siberian Medical Sciences.* 2018;4:4-12. DOI: 10.31549/2542-1174-2018-4-4-12.
6. Салов И.А., Аржаева И.А., Тяпкина Д.А. Использование лазерного излучения в лечении воспалительных заболеваний придатков матки // *Акушерство, гинекология и репродукция.* 2022;16(5):552-566. DOI: 10.17749/2313-7347/ob.gyn.rep.2022.323.

normalization of the balance of pro- and anti-inflammatory cytokines, which indicates an adequate favorable inflammatory response.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно полученным результатам МЛТ оказывает многокомпонентное и патогенетическое влияние при ХСО.

Определение уровня цитокинов до и после лечения пациенток с ХСО позволило оценить динамику воспалительного процесса при ХСО при применении МЛТ. Использование МЛТ в лечении обострения ХСО приводит к снижению спонтанной продукции ИЛ-1 $\beta$  и нормализации баланса про- и противовоспалительных цитокинов, что свидетельствует об адекватном благоприятном воспалительном ответе.

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

## REFERENCES

1. Savaris R.F., Fuhrich D.G., Maissiat J. et al. Antibiotic therapy for pelvic inflammatory disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2020;8(8):CD010285. DOI: 10.1002/14651858.CD010285.pub3.
2. Selikhova M.S., Soltys P.A. Modern accents in the diagnostics of inflammatory diseases of the pelvic organs. *V.F. Snegirev Archives of Obstetrics and Gynecology, Russian Journal.* 2020;1(7):37-42. DOI: 10.18821/2313-8726-2020-7-1-37-42. (In Russ.)
3. Shatunova E.P., Fedorina T.A. Lineva O.I., Kuznetsova L.V. Clinical and pathomorphological characteristics of patients with purulent inflammation of the uterine appendages. *Obstetrics and Gynecology.* 2021;(10):118-124. DOI 10.18565/aig.2021.10.118-124. (In Russ.)
4. Ravel J., Moreno I., Simón C. Bacterial vaginosis and its association with infertility, endometritis, and pelvic inflammatory disease. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2021;224(3):251-257. DOI: 10.1016/j.ajog.2020.10.019.
5. Belyakova I.A., Nikiforova O.Yu., Urazova O.I. et al. Dynamics of the cytokine profile in children and adolescents with tuberculosis of the intrathoracic lymph nodes in the course of field-modulated infrared therapy. *Journal of Siberian Medical Sciences.* 2018;4:4-12. DOI: 10.31549/2542-1174-2018-4-4-12.
6. Salov I.A., Arzhaeva I.A., Tyapkina D.A. Application of laser radiation in treatment of inflammatory diseases of the uterine appendages. *Obstetrics, Gynecology and Reproduction.* 2022;16(5):552-566. DOI: 10.17749/2313-7347/ob.gyn.rep.2022.323. (In Russ.)

7. Мальцева Л.И., Шарипова Р.И., Железова М.Е. Хронический эндометрит – смена привычных представлений // Практическая медицина. 2018;16(6):99-105.
8. Moreno I., Cicinelli E., Garcia-Grau I. et al. The diagnosis of chronic endometritis in infertile asymptomatic women: a comparative study of histology, microbial cultures, hysteroscopy, and molecular microbiology // *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2018;218(6):602.e1-602.e16. DOI: 10.1016/j.ajog.2018.02.012.
9. Воспалительные болезни женских тазовых органов: Клинические рекомендации. 2021. URL: [https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/643\\_1](https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/643_1) (дата обращения: 26.02.2024).
10. Муким-зода Т.М., Ходжамуродова Д.А. Воспалительные заболевания органов малого таза и длительное использование внутриматочной контрацепции (клинический случай) // *Медицинский алфавит.* 2019;2(14):47-51. DOI: 10.33667/2078-5631-2019-2-14(389)-47-51.
11. Curry A., Williams T., Penny M.L. Pelvic Inflammatory disease: diagnosis, management, and prevention // *Am. Fam. Physician.* 2019;100(6): 357-364.
12. Machairiotis N., Vasilakaki S., Thomakos N. Inflammatory mediators and pain in endometriosis: a systematic review // *Biomedicines.* 2021;9(1):54. DOI: 10.3390/biomedicines9010054.
13. Fan L., Liu Z., Zhang Z. et al. Identifying the clinical presentations, progression, and sequela of pelvic inflammatory disease through physiological, histological and ultrastructural evaluation of a rat animal model // *Ann. Transl. Med.* 2021;9(23):1710. DOI: 10.21037/atm-21-3345.
14. Озолина Л.А., Овсепян Н.Р. Профилактика воспалительных осложнений после самопроизвольного выкидыша. Возможности современных методов физиотерапии // *Лечение и профилактика.* 2018;8(2):48-55.
7. Maltseva L.I., Sharipova R.I., Zhelezova M.E. Chronic endometritis – changing conventional thinking. *Practical Medicine.* 2018;16(6):99-105. (In Russ.)
8. Moreno I., Cicinelli E., Garcia-Grau I. et al. The diagnosis of chronic endometritis in infertile asymptomatic women: a comparative study of histology, microbial cultures, hysteroscopy, and molecular microbiology. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2018;218(6):602.e1-602.e16. DOI: 10.1016/j.ajog.2018.02.012.
9. Inflammatory diseases of female pelvic organs: Clinical guidelines. 2021. URL: [https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/643\\_1](https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/643_1) (accessed 26.02.2024).
10. Mukim-Zoda T.M., Hojamurodova D.A. Inflammatory diseases of pelvic organs and longed use of intrauterine contraception (clinical case). *Medical Alphabet.* 2019;2(14):47-51. DOI: 10.33667/2078-5631-2019-2-14(389)-47-51. (In Russ.)
11. Curry A., Williams T., Penny M.L. Pelvic Inflammatory disease: diagnosis, management, and prevention. *Am. Fam. Physician.* 2019;100(6): 357-364.
12. Machairiotis N., Vasilakaki S., Thomakos N. Inflammatory mediators and pain in endometriosis: a systematic review. *Biomedicines.* 2021;9(1):54. DOI: 10.3390/biomedicines9010054.
13. Fan L., Liu Z., Zhang Z. et al. Identifying the clinical presentations, progression, and sequela of pelvic inflammatory disease through physiological, histological and ultrastructural evaluation of a rat animal model. *Ann. Transl. Med.* 2021;9(23):1710. DOI: 10.21037/atm-21-3345.
14. Ozoliny L.A., Ovsepyan N.R. Prevention of inflammatory complications after spontaneous miscarriage. Capabilities of modern methods of physiotherapy. *Treatment and Prevention.* 2018;8(2):48-55. (In Russ.)

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

**Шатунова Елена Петровна** – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой акушерства и гинекологии с курсом эндоскопической хирургии и симуляционно-тренингового обучения Медицинского университета «Реавиз»; профессор кафедры общей и клинической патологии: патологической анатомии и патологической физиологии ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России, Самара, Россия. ORCID: 0000-0001-7381-2243.

**Степанова Юлия Владимировна** – канд. мед. наук, старший преподаватель кафедры акушерства и гинекологии с курсом эндоскопической хирургии и симуляционно-тренингового обучения Медицинского университета «Реавиз»; врач – акушер-гинеколог ГБУЗ «Самарская городская клиническая больница № 1 им. Н.И. Пирогова», Самара, Россия. ORCID: 0000-0002-0362-4412.

**Слатова Людмила Николаевна** – канд. мед. наук, доцент кафедры общей и клинической патологии: патологической анатомии и патологической физиологии ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России, Самара, Россия. ORCID: 0000-0001-8334-2134.

## ABOUT THE AUTHORS

**Elena P. Shatunova** – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head, Department of Obstetrics and Gynecology with a Course in Endoscopic Surgery and Simulation Training, Medical University “Reaviz”; Professor, Department of General and Clinical Pathology: Pathological Anatomy and Pathological Physiology, Samara State Medical University, Samara, Russia. ORCID: 0000-0001-7381-2243.

**Yulia V. Stepanova** – Cand. Sci. (Med.), Senior Lecturer, Department of Obstetrics and Gynecology with a Course in Endoscopic Surgery and Simulation Training, Medical University “Reaviz”; Obstetrician and Gynecologist, N.I. Pirogov Samara City Clinical Hospital No. 1, Samara, Russia. ORCID: 0000-0002-0362-4412.

**Lyudmila N. Slatova** – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Department of General and Clinical Pathology: Pathological Anatomy and Pathological Physiology, Samara State Medical University, Samara, Russia. ORCID: 0000-0001-8334-2134.

## Поздняя стадия аксиального спондилоартрита: отсроченная диагностика и выявление потенциальных предикторов прогрессирования заболевания

Е.С. Юшина, Е.В. Зонова

ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия

### АННОТАЦИЯ

В обзоре представлены данные литературы, посвященные поздней стадии аксиального спондилоартрита (аксСпА). Помимо характерных рентгенологических проявлений, для пациентов с поздней стадией свойственно формирование сагиттального дисбаланса и контрактурных деформаций позвоночника, что потенциально может привести к инвалидизации, потере трудоспособности и ухудшению качества жизни. Одной из причин развития поздней стадии по-прежнему остается запоздалая диагностика. Несмотря на появление критериев ASAS в 2009 г., постановка диагноза задерживается на несколько лет во всем мире. В связи с этим предпринимаются попытки выделить факторы поздней диагностики, например, такие как женский пол, молодой возраст дебюта заболевания, HLA-B27-отрицательный результат, наличие псориаза, увеита и т.д., однако до сих пор однозначного мнения на этот счет нет. Важно отметить, что предметом обсуждения являются ранняя диагностика и раннее лечение; для доказательства их положительного влияния на пациентов с аксСпА требуется проведение грамотно спланированных долгосрочных исследований. Исходя из данных о важности сохранения трудоспособности, функционального статуса у лиц трудоспособного и детородного возраста, страдающих аксСпА, стоит вопрос о целесообразности изучения предикторов формирования поздней стадии заболевания и, следовательно, неблагоприятных функциональных исходов. По литературным данным наиболее подходящими кандидатами могли бы стать склеростин, Dickkopf-1 (Dkk-1) и висфатин. Требуется разработка параметров, ассоциированных с возможностью использования потенциальных маркеров, для составления тактики ведения пациентов с прогрессирующим течением спондилоартрита в инвалидизирующее состояние.

**Ключевые слова:** поздняя стадия аксиального спондилоартрита, поздняя диагностика, предикторы прогрессии аксиального спондилоартрита, склеростин, висфатин, диккопф.

**Образец цитирования:** Юшина Е.С., Зонова Е.В. Поздняя стадия аксиального спондилоартрита: отсроченная диагностика и выявление потенциальных предикторов прогрессирования заболевания // Journal of Siberian Medical Sciences. 2024;8(3):136-153. DOI: 10.31549/2542-1174-2024-8-3-136-153

## Advanced axial spondyloarthritis: delayed diagnosis and identification of potential predictors of disease progression

E.S. Yushina, E.V. Zonova

Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia

### ABSTRACT

This review summarizes literature data on advanced axial spondyloarthritis (axSpA). In addition to the characteristic radiological manifestations, patients with advanced axSpA are characterized by sagittal imbalance and contracture-related deformities of the spine, which can potentially lead to disability, loss of working capacity and a decrease in the quality of life. Delayed diagnosis remains one of the reasons for advanced stage development. Despite the introduction of the ASAS

Поступила в редакцию 23.01.2024  
Прошла рецензирование 04.03.2024  
Принята к публикации 31.03.2024

Автор, ответственный за переписку  
Юшина Елена Сергеевна: ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России. 630091, г. Новосибирск, Красный просп., 52.  
E-mail: elena.s@yuschina.ru

Received 23.01.2024  
Revised 04.03.2024  
Accepted 31.03.2024

Corresponding author  
Elena S. Yushina: Novosibirsk State Medical University, 52, Krasny prosp., Novosibirsk, 630091, Russia.  
E-mail: elena.s@yuschina.ru

criteria in 2009, diagnosis is delayed for several years worldwide. In this regard, attempts are being made to identify factors for delayed diagnosis, for example, female gender, young age of the disease onset, HLA-B27 negativity, presence of psoriasis, uveitis, etc., but there is still no unequivocal opinion on this issue. It is important to note that the subject of discussion is early diagnosis and early treatment; well-designed long-term studies are required to prove their positive impact on patients with axSpA. Based on the data on the importance of preserving working capacity and functional status in people of working and childbearing age suffering from axSpA, there is a question about the advisability of studying predictors of the formation of the advanced stage of the disease and, consequently, unfavorable functional outcomes. According to the literature, the most suitable candidates would be sclerostin, Dickkopf-1 (Dkk-1) and visfatin. The development of parameters associated with the possibility of using potential markers is required to formulate tactics for the management of patients with progression of spondyloarthritis into a disabling condition.

**Keywords:** advanced stage of axial spondyloarthritis, delayed diagnosis, predictors of axial spondyloarthritis progression, sclerostin, visfatin, Dickkopf.

**Citation example:** Yushina E.S., Zonova E.V. Advanced axial spondyloarthritis: delayed diagnosis and identification of potential predictors of disease progression. *Journal of Siberian Medical Sciences*. 2024;8(3):136-153. DOI: 10.31549/2542-1174-2024-8-3-136-153

## ВВЕДЕНИЕ

Спондилоартриты (SpA) – группа воспалительных ревматических заболеваний, главными общими признаками которых являются воспалительные изменения в крестцово-подвздошных суставах (КПС) и позвоночнике. В число дополнительных, объединяющих данную группу проявлений входят периферический олигоартрит, поражающий преимущественно суставы нижних конечностей, энтезит, дактилит, увеит, псориаз, воспалительные заболевания кишечника (ВЗК), а также генетическая предрасположенность и наличие антигена HLA-B27. На сегодняшний день к группе SpA относят следующие состояния: анкилозирующий спондилит (АС), псориатический артрит (ПсА), реактивный артрит, артриты, ассоциированные с ВЗК, и недифференцированный SpA [1]. Ключевым симптомом у пациентов с вышеперечисленными нозологиями является хроническая боль в спине. Учитывая этот факт и сложившуюся потребность в простоте и скорости диагностики данного состояния, Assessment of SpondyloArthritis international Society (ASAS) в 2009 г. разработало критерии воспалительной боли в спине (ВБС). Тот же год стал переломным в понимании и изучении SpA, так как обществом ASAS были предложены классификационные критерии для аксиального спондилоартрита (акс-SpA) [2], а в 2011 г. – для периферического SpA [3]. Таким образом, в обширной группе SpA в настоящее время выделяют две основные клинические разновидности: аксиальную и периферическую. С тех пор особое внимание стало уделяться изучению именно аксSpA, характеризующегося преимущественным поражением осевого скелета

## INTRODUCTION

Spondyloarthritis (SpA) is a group of inflammatory rheumatic diseases, the common symptoms of which are inflammatory changes in the sacroiliac joints (SIJ) and the spine. Additional unifying manifestations of this group include peripheral oligoarthritis, predominantly affecting the joints of the lower extremities, enthesitis, dactylitis, uveitis, psoriasis, inflammatory bowel disease (IBD), as well as genetic predisposition and the presence of human leucocyte antigen (HLA-B27). To date, the SpA group includes the following conditions: ankylosing spondylitis (AS), psoriatic arthritis (PsA), reactive arthritis, arthritis associated with IBD, and undifferentiated SpA [1]. The key symptom in patients with the above nosologies is chronic back pain. Considering this fact and the current need for easy and quick diagnosis of this condition, the Assessment of SpondyloArthritis international Society (ASAS) developed criteria for inflammatory back pain (IBP) in 2009. The same year became a turning point in the understanding and study of SpA, as the ASAS proposed classification criteria for axial spondyloarthritis (axSpA) [2], and in 2011 – for peripheral SpA [3]. Thus, in the vast group of SpA, two main clinical varieties are distinguished currently: axial and peripheral. Since then, special attention has been paid to the study of axSpA, which is characterized by predominant lesion of the axial skeleton (spine, SIJ). The structure of axSpA, in turn, includes non-radiological axSpA (nr-axSpA) and AS (nowadays, the latter is called radiological axSpA (r-axSpA)) [4–6].

The prevalence of axSpA is known mainly through the prism of AS. The prevalence of the latter, in turn, is associated with the detection of

(позвоночник, КПС). В структуре аксСпА, в свою очередь, выделяют нерентгенологический аксСпА (нр-аксСпА) и АС (последний стали называть рентгенологическим аксСпА (р-аксСпА)) [4–6].

О распространенности аксСпА известно в основном через призму АС. Распространенность последнего, в свою очередь, ассоциирована с обнаружением антигена HLA-B27 в определенной популяции и характеризуется постепенным нарастанием от экватора (0%) к приарктическим регионам (25–40 %). Установлено, что данный показатель среди жителей средних широт и европеоидной расы находится в диапазоне от 0.1 до 0.2 % [7]. Существуют данные по распространенности АС, которая в Северной Америке составляет 0.32 %, в Латинской Америке – 0.1 %, в Европе – 0.24 %, в Азии – 0.17 %, в Африке – 0.07 % [8]. После выделения обществом ASAS аксСпА в качестве отдельной нозологии стали появляться исследования, в которых изучалась распространенность не АС, а непосредственно аксСпА с использованием критериев ASAS, которая составила в США 0.72 % [9], во Франции – 0.32 % [10], в Норвегии – 0.13 % [11]. Однако в отечественной литературе до сих пор нет точных данных о распространенности вышеперечисленных нозологий. Статистика Минздрава РФ предоставляет информацию лишь по общей группе спондилопатий, что составляет 125 600 больных, среди которых на АС приходится примерно 44 %. По данным, полученным в ходе интервью с экспертами, определен средний показатель распространенности нр-аксСпА – 30 % от числа случаев АС [12]. В зарубежных источниках говорится об одинаковой частоте АС и нр-аксСпА по отношению друг к другу [13]. Таким образом, точной информации о распространенности АС и нр-аксСпА в России до сих пор нет. Однако, несмотря на кажущуюся низкую значимость эпидемиологических данных, пациенты с аксСпА соответствуют трудоспособному возрасту, испытывая ограничения в повседневной жизни, что требует внимательного подхода к диагностике и лечению. Все это говорит о том, что актуальность данного заболевания не уменьшается и по-прежнему вызывает интерес в научном медицинском сообществе.

### **МНОГООБРАЗИЕ КЛИНИЧЕСКОЙ КАРТИНЫ аксСпА**

Особенно интересна клиническая картина аксСпА, которая привлекает внимание клиницистов и ученых своей мультифакториальной и раз-

HLA-B27 in a certain population and is characterized by a gradual increase from the equator (0%) to subarctic regions (25–40%). It has been found that this indicator among residents of mid-latitudes and Caucasian race ranges from 0.1 to 0.2% [7]. There are data on the prevalence of AS, which in North America is 0.32%, in Latin America – 0.1%, in Europe – 0.24%, in Asia – 0.17%, in Africa – 0.07% [8]. After the ASAS has identified axSpA as a separate nosology, studies began to appear that assessed the prevalence not of AS, but of axSpA itself, using the ASAS criteria, which amounted to 0.72% in the USA [9], in France – 0.32% [10], in Norway – 0.13% [11]. However, in the domestic literature there is still no accurate data on the prevalence of the abovementioned nosologies. The statistics from the Ministry of Health of the Russian Federation provide information only on the general group of spondylopathies, which amounts to 125 600 patients, of which AS accounts for approximately 44%. According to data obtained during interviews with experts, the average prevalence rate of nr-axSpA was determined to be 30% of the number of AS cases [12]. Foreign sources report the same frequency of AS and nr-axSpA in relation to each other [13]. Thus, there is still no accurate information on the prevalence of AS and nr-axSpA in Russia. However, despite the seemingly low significance of epidemiological data, patients with axSpA are of working age, experiencing limitations in daily life, which requires an attentive approach to diagnosis and treatment. All this suggests that the relevance of this disease is not diminishing and still arouses interest in the scientific medical community.

### **THE VARIETY OF THE axSpA CLINICAL PICTURE**

The clinical picture of axSpA is especially interesting, attracting the attention of clinicians and scientists due to its multifactorial and heterogeneous nature. It is known that the pathogenesis is influenced by a whole set of genetic, immunologic, infectious and other factors [14], and the wide range of clinical symptoms of axSpA can be verified by returning to the abovementioned ASAS classification criteria [15]. The Russian clinical recommendations, in turn, directly point to several groups of clinical signs. In addition to inflammation in the spine and SIJ, the presence of extra-axial and extraskelatal manifestations is possible. Extra-axial lesions include pathology of the musculoskeletal system related directly to the disease, namely arthritis and enthesitis, dactyli-

народной природой. Известно, что на патогенез влияет целая совокупность генетических, иммунологических, инфекционных и прочих факторов [14], а в богатстве клинических симптомов аксСпА можно удостовериться, возвращаясь к вышеупомянутым классификационным критериям ASAS [15]. В российских клинических рекомендациях, в свою очередь, непосредственно указывают на несколько групп клинических признаков. Помимо воспаления в позвоночнике и КПС возможно наличие внеаксиальных и внескелетных проявлений. К внеаксиальным поражениям относят патологию опорно-двигательного аппарата, напрямую связанную с заболеванием, а именно артрит и энтезит, дактилит. Группа внескелетных поражений довольно разнообразна и включает увеит, псориаз, ВЗК, IgA-нефропатию, поражение аорты, нарушения проводящей системы сердца. Стоит отметить, что осложнения данного заболевания также отличаются многообразием (например, шейно-грудной кифоз, амилоидоз, контрактуры, подвывих атлантоаксиального сустава и др.) [16]. Соответственно, картина аксСпА может быть представлена широким спектром проявлений – от легких, «малосимптомных», практически не беспокоящих пациента, до более тяжелых, приводящих к инвалидизации буквально за несколько лет.

Нарушение функции характерно для аксСпА, но особенно для пациентов с поздним статусом, так как именно на этой финальной клинической стадии процесс анкилозирования движется к завершению, а следовательно, ведет к деформациям и снижению качества жизни.

### ПОЗДНЯЯ СТАДИЯ аксСпА

Ни в зарубежной, ни в отечественной литературе нет развернутого определения термина «поздняя стадия аксСпА». Данное понятие встречается лишь в клинической классификации аксСпА, где выделяют следующие стадии по рентгенологической картине: 1) дорентгенологическая; 2) развернутая; 3) поздняя. Последняя подразумевает под собой наличие достоверного сакроилиита (двусторонний второй стадии и выше или односторонний третьей стадии и выше по Келлгрэну) и четких структурных изменений в позвоночнике (сакроилиит в сочетании с синдесмофитами) [16]. Встречающееся в статьях понятие «поздняя стадия аксСпА» описывает состояние пациента, при котором формируется анкилоз в КПС и/или в каких-либо отделах позвоночника.

В клинической практике на поздних стадиях аксСпА в большинстве случаев возникают дефор-

tis. The group of extraskeletal lesions is quite diverse and includes uveitis, psoriasis, IBD, IgA nephropathy, aortic lesions, and disorders of the cardiac conduction system. It is worth noting that the complications of this disease are also diverse (for example, cervicothoracic kyphosis, amyloidosis, contractures, atlantoaxial subluxation, etc.) [16]. Accordingly, the picture of axSpA can be represented by a wide range of manifestations – from mild, asymptomatic, virtually not bothering a patient, to more severe ones, leading to disability in just a few years.

Functional impairment is characteristic of axSpA, but especially for patients with advanced stage, since it is at this final clinical stage that the ankylosing process moves towards completion, and therefore leads to deformities and reduced quality of life.

### ADVANCED STAGE OF axSpA

Neither in foreign nor in domestic literature, there is a detailed definition of the term “advanced stage of axSpA”. This concept is found only in the clinical classification of axSpA, where the following stages are distinguished according to the radiological picture: 1) pre-radiological; 2) developed; 3) advanced. The latter implies the presence of definite sacroiliitis (bilateral grade 2 and above or unilateral grade 3 and above according to the Kellgren-Lawrence system) and definite structural changes in the spine (sacroiliitis combined with syndesmophytes) [16]. The term “advanced axSpA” found in articles describes the patient’s condition in which ankylosis is formed in the SIJ and/or in any parts of the spine.

In clinical practice, in most cases, spinal deformities, such as flattening of lumbar lordosis or increased thoracic kyphosis, occur at the advanced stages of axSpA. This can lead to structural and functional impairments, as well as a decrease in quality of life [17]. In addition, in advanced axSpA, severe sagittal imbalance and contracture-related deformities of the spine are noted, which may be an additional cause of back pain. Impaired extension in the cervical spine with limited gaze (especially when looking forward), as well as neurological disorders develop [18]. Complications such as difficulty walking, abdominal organ movement restriction, and pulmonary dysfunction may occur in patients with severe kyphotic deformities of axSpA [19]. In addition, axSpA sufferers may have difficulty in lying or standing position, which seriously impairs their daily activities and quality of life [20]. The main manifestations of the late stage of the disease are [21]:

- feeling of stiffness;
- restriction of chest movement;
- back and/or joint pain;

мации позвоночника, такие как исчезновение поясничного лордоза или увеличение грудного кифоза. Это может привести к структурным и функциональным нарушениям, а также к ухудшению качества жизни [17]. Кроме того, на поздних стадиях аксСпА отмечается тяжелый сагитальный дисбаланс, контрактурные деформации позвоночника, что может быть дополнительной причиной боли в спине. Развивается изменение разгибания в шейном отделе позвоночника с ограничением зрения (особенно при взгляде вперед), а также неврологические нарушения [18]. Такие осложнения, как трудности при ходьбе, ограничение объема движений органов брюшной полости и дисфункция легких, могут возникать у пациентов с аксСпА с тяжелыми кифотическими деформациями [19]. Помимо этого, страдающие аксСпА могут испытывать затруднения в положении лежа или стоя, что серьезно ухудшает их повседневную деятельность и качество жизни [20]. Основными проявлениями поздней стадии заболевания являются [21]:

- чувство скованности;
- ограничение движения грудной клетки;
- боль в спине и/или суставах;
- усталость;
- плохой сон;
- наличие косметического дефекта.

Большинство из вышеперечисленных симптомов нередко ведут к ограничению функциональных возможностей, потере трудоспособности, смене рабочего места или раннему выходу на пенсию, что подтверждается во многих зарубежных исследованиях. В статье Е. Nikiphorou, S. Ramiros собрана информация о таких исследованиях в разных странах [22]. Например, по данным французского исследования доля пациентов с 20-летней продолжительностью болезни, досрочно прекративших трудовую деятельность, составляет 36 %. В Финляндии оценивали группу пациентов с 10-летней продолжительностью АС и группу с длительностью более 25 лет. В первом случае сообщалось о 5 %, во втором – о 30 % утраты возможности работы по специальности. По данным испанского исследования показатель нетрудоспособности пациентов с аксСпА составляет 26 %. Средний возраст выхода на пенсию в турецком исследовании составил  $36 \pm 4.2$  года. Кросс-секционные данные по 17 регионам Италии показали, что 21 % пациентов был вынужден сменить или оставить работу по причине своей болезни. Таким образом, данные о прекращении трудовой деятельности по болезни сильно различаются в разных странах, например, 16 % в Вели-

- fatigue;
- sleep deprivation;
- cosmetic defect.

Most of the abovementioned symptoms often lead to limitation in functional capabilities, disability, change of occupation or early retirement, which is confirmed in many foreign studies. Nikiphorou, Ramiros have collected information about such studies in different countries [22]. For example, according to French data, a proportion of patients with a 20-year duration of the disease who stopped working early was 36%. In Finland, a group of patients with a 10-year duration of AS and a group with a duration of more than 25 years were evaluated. Loss of opportunity to work in the profession in the first group was reported to be 5%, in the second – 30%. According to a Spanish study, the disability rate of patients with axSpA is 26%. The mean age of retirement in the Turkish study was  $36 \pm 4.2$  years. Cross-sectional data from 17 regions of Italy showed that 21% of patients were forced to change or leave their jobs due to their illness. Thus, the data on sickness-related work termination vary widely across countries, e.g. 16% in the UK, 48% in France, and 52% in the Netherlands [22], which depends on the choice of an assessment method due to the lack of a single standardized approach.

In Russia, there are the following data on this matter. According to the results of a multicenter cross-sectional study by Volnukhin et al. among 330 patients from 24 Russian cities with an average duration of AS of 15 years, 51.5% of patients were officially pronounced disabled. It was also revealed that 90 (27%) of the total number of patients with AS had disability group III, 76 (23%) – group II, 4 (1.2%) – group I. The mean age of patients who received a disability status was 46.3 years [23]. Later, a study was performed by Podryadnova et al., according to the results of which 56.4% of patients were assigned a disability group I, II or III – 2.3, 24 and 30%, respectively. The mean age of patients with lost or limited ability to work was  $36.7 \pm 9.7$  years. Among the patients with disability, 55 (44.4%) continued to work [24]. According to the V.A. Nasonova Research Institute of Rheumatology, almost 50% of patients become disabled on average at the age of 40 years – already 7 years after the diagnosis of AS [25]. Thus, the abovementioned data once again confirm that axSpA (AS in particular) is a disease that causes serious damage to patients, predominantly of young working age. It is known that typically, the onset of AS occurs at 16–30 years of age [25], the peak incidence is registered at 25–35 years of age [16], and disability occurs approximately between 36 and

критании, 48 % во Франции и 52 % в Нидерландах [22], что зависит от выбора метода оценки в связи с отсутствием единого стандартизованного подхода.

В России имеются следующие данные на этот счет. По результатам многоцентрового одномерного исследования Е.В. Волнухина и соавт. среди 330 пациентов из 24 российских городов со средней длительностью АС 15 лет 51.5 % больных официально были признаны инвалидами. Также было выявлено, что у 90 (27 %) от общего количества пациентов с АС была установлена III группа инвалидности, у 76 (23 %) – II, у 4 (1.2 %) – I. Средний возраст пациентов, достигших статуса инвалидности, составил 46.3 года [23]. Позже было проведено исследование М.В. Подрядновой и соавт., по результатам которого как инвалиды освидетельствованы 56.4 % больных I, II и III группы инвалидности – 2.3, 24 и 30 % соответственно. Средний возраст пациентов с утраченной или ограниченной трудоспособностью составил  $36.7 \pm 9.7$  года. Среди пациентов, имеющих инвалидность, 55 (44.4 %) продолжали работать [24]. По данным НИИ ревматологии им. В.А. Насоновой почти 50 % больных становятся инвалидами в среднем в возрасте 40 лет уже через 7 лет после диагностики АС [25]. Таким образом, вышеизложенные данные в очередной раз подтверждают, что аксСпА (АС в частности) является заболеванием, наносящим серьезный ущерб пациентам преимущественно молодого трудоспособного возраста. Известно, что наиболее часто дебют АС приходится на 16–30 лет [25], пик заболеваемости – на 25–35 лет [16], а инвалидность наступает приблизительно в промежутке от 36 до 46 лет, как уже было сказано ранее. В связи с этим возникает логичный вопрос о сроках постановки диагноза, поскольку промедление в диагностике может привести к более высокой активности заболевания, формированию структурных повреждений, снижению функциональной активности, потере трудоспособности и ухудшению качества жизни пациентов. Помимо этого, не стоит забывать об экономическом бремени аксСпА, так как при своевременной постановке диагноза и вовремя начатом лечении прямые и косвенные затраты на таких пациентов будут значительно снижены [12, 26].

### ПОЗДНЯЯ ДИАГНОСТИКА АС

До появления критериев ASAS диагностика АС задерживалась в европейских странах в среднем на 5–10 лет [27], в России, по данным Е.В. Волнухина и соавт., – на 9 лет [23]. Однако

46 years of age, as mentioned earlier. In this regard, a logical question arises about the timeliness of diagnosis, since a delay can result in a higher disease activity, development of structural lesions, reduced functional activity, loss of work capacity, and a decrease in quality of life of patients. In addition, we should not forget about the economic burden of axSpA, since with timely diagnosis and timely treatment, direct and indirect costs for such patients will be significantly reduced [12, 26].

### DELAYED DIAGNOSIS OF AS

Before the ASAS criteria were introduced, the diagnosis of AS was delayed in European countries by an average of 5–10 years [27], in Russia, according to Volnukhin et al., for 9 years [23]. However, after the introduction of these criteria, diagnosis has improved significantly: the median delay in diagnosis worldwide began to range from 2 to 6 years (for example, in the UK, it now requires 5–6 years, in Turkey – from 2 to 6 years, in Germany – 2.3–5 years, in India – an average of 3 years) [28, 29]. In Russia, a similar analysis using the new ASAS criteria has not been conducted. There is a reference to the reduction in the period from the onset of the disease to diagnosis from 8.4 to 3.5 years, i.e. almost 2 times, after conducting educational programs on early detection of AS for primary care doctors in Kazan. But at that time, the Russian version of the modified New York criteria (1984) was used [30]. Thus, the problem of late diagnosis persists throughout the world, regardless of the patient's country of residence [29].

### FACTORS AND REASONS FOR DELAYED DIAGNOSIS

Many researchers have aimed to identify factors that could influence the delay of diagnosis in patients with axSpA. For example, in a large European study, EMAS (European Map of Axial Spondyloarthritis), which involved 2652 patients from 13 countries, it was found that young age at onset, female gender, high number of related medical professionals seen before the diagnosis were the parameters associated with late diagnosis of axSpA [28]. In the study by Redeker et al., female gender and young age at onset of symptoms were confirmed as factors for late diagnosis. But, in addition, scientists noted HLA-B27 negativity and the presence of psoriasis as equally important factors in delayed diagnosis [31]. It should be said that to date, many such studies have been conducted to investigate the role of factors and their possible association with delayed diagnosis. The

после внедрения вышеуказанных критериев диагностика значительно улучшилась: медиана задержки постановки диагноза во всем мире стала формироваться в интервале от 2 до 6 лет (например, в Великобритании теперь требуется 5–6 лет, в Турции – от 2 до 6 лет, в Германии – 2.3–5 лет, в Индии – в среднем 3 года) [28, 29]. В России подобный анализ с использованием новых критериев ASAS не проводился. Есть упоминание о сокращении периода от начала заболевания до установления диагноза с 8.4 до 3.5 года, т.е. почти в 2 раза, после проведения образовательных программ по раннему выявлению АС для врачей первичного звена в г. Казани. Но на тот момент была использована Российская версия модифицированных Нью-Йоркских критериев (1984 г.) [30]. Таким образом, проблема поздней диагностики сохраняется во всем мире вне зависимости от страны проживания пациента [29].

### ФАКТОРЫ И ПРИЧИНЫ ПОЗДНЕЙ ПОСТАНОВКИ ДИАГНОЗА

Многие исследователи ставили перед собой цель выделить факторы, которые могли бы оказать влияние на задержку в постановке диагноза пациентам с аксСпА. Так, например, в крупном европейском исследовании EMAS (European Map of Axial Spondyloarthritis), в котором участвовало 2652 пациента из 13 стран, было выявлено, что молодой возраст в дебюте, женский пол, длительное хождение по смежным специалистам были параметрами, связанными с поздней диагностикой аксСпА [28]. В исследовании I. Redeker et al. женский пол и молодой возраст при появлении симптоматики подтвердились как факторы несвоевременной диагностики. Но, помимо этого, ученые отмечали HLA-B27-отрицательный результат и наличие псориаза в качестве не менее важных факторов в запоздалой постановке диагноза [31]. Следует сказать, что на сегодняшний день проведено немало таких исследований, направленных на изучение роли факторов и их возможной связи с задержкой диагностики. Наиболее актуальным систематическим обзором, в котором объединены все имеющиеся статьи, посвященные данной проблематике, стал обзор С.А. Ная et al. В общей сложности в нем собраны 45 исследований, в которых суммарно сообщалось о 47 различных факторах. Все они были разделены на 16 категорий. Большинство из них исследовались только один раз в одном исследовании, но 7 факторов встречались более чем в пяти отдельных исследованиях: пол, HLA-B27-

most relevant systematic review, which includes all available articles on this issue, was the review by Hay et al. In total, it comprises 45 studies that have summarized 47 different factors. All of them were divided into 16 categories. Most of them were examined only once in a single study, but 7 factors were found in more than five separate studies: gender, HLA-B27 status, radiographic detection of sacroiliitis (radiological and non-radiological axSpA), age of disease onset, family history of axSpA, presence or absence of uveitis at disease onset, as well as presence or absence of peripheral arthritis. The results differed from those of the studies cited earlier: of these factors, gender and family history do not seem to influence the diagnosis delay. As for the rest five parameters, the authors of the review considered the evidence for the association between these factors and delayed diagnosis to be contradictory or limited [29].

Other researchers are not only searching factors, but are trying to identify a number of reasons that would explain why there is a delay in making the correct diagnosis. All currently known reasons for delayed diagnosis [30, 32, 33] can be divided into 3 groups:

1) *nosological* (determined by the characteristics of the disease itself):

- diversity of the clinical picture of axSpA at the onset (i.e. in addition to IBP and involvement of the axial skeleton, joints, entheses and individual organs (eyes, gastrointestinal tract, etc.) may be affected);
- asymptomatic course of axSpA at the onset (i.e. a scanty set of symptoms that could force the patient to seek medical attention);
- slow development (up to several years) of radiological signs of sacroiliitis;
- slow development (up to several years) of structural changes in the axial skeleton from the moment the symptoms of IBP appear;
- back pain mimicking other conditions (after exercise, trauma, due to disc herniation, protrusion, etc.);

2) *medical* (due to the doctor's educational level):

- low level of awareness of this disease among primary care physicians, who consider axSpA a rare pathology and an exclusively male disease, and are also unaware of the ASAS criteria for IBP;
- low level of awareness of axSpA among doctors of related specialties (on average, patients are consulted by 6–8 specialists before being seen by a rheumatologist);

3) *personal* (determined by the patient himself):

- individual peculiarities of the body which affect the course of the disease (all patients

принадлежность, выявление сакроилиита на рентгенограмме (рентгенологический и нерентгенологический аксСпА), возраст дебюта заболевания, семейный анамнез аксСпА, наличие или отсутствие увеита в начале болезни, а также наличие или отсутствие периферического артрита. В результате были получены данные, отличающиеся от данных исследований, приведенных ранее: из этих факторов пол и семейный анамнез, по-видимому, не влияют на задержку диагностики. Что касается остальных пяти параметров, то авторы обзора считают данные об ассоциации между этими факторами и задержкой диагностики противоречивыми или ограниченными [29].

Другие ученые занимаются не только поиском факторов, а стараются выделить ряд причин, которые бы объяснили, почему происходит задержка постановки правильного диагноза. Все известные на сегодняшний день причины поздней постановки диагноза [30, 32, 33] можно разделить на 3 группы:

1) *нозологические* (обусловленные особенностями самой болезни):

- разнообразие клинической картины аксСпА в дебюте (т.е. помимо ВБС и вовлечения осевого скелета, возможно поражение суставов, энтезисов и отдельных органов (глаз, ЖКТ и т.д.);
- малосимптомное течение аксСпА в дебюте (т.е. скудный набор симптомов, который мог бы заставить пациента обратиться за медицинской помощью к врачу);
- медленное развитие (до нескольких лет) рентгенологических признаков сакроилиита;
- медленное развитие (до нескольких лет) структурных изменений в аксиальном скелете с момента возникновения симптомов ВБС;
- мимикрия боли в спине под другие состояния (после физической нагрузки, травмы, по причине грыжи межпозвоночного диска, протрузий и т.д.);

2) *врачебные* (обусловленные образованием врача):

- низкий уровень осведомленности о данной болезни у врачей первичного звена, которые называют аксСпА редкой патологией и исключительно мужским заболеванием, а также не знают о критериях ВБС, разработанных ASAS;
- низкий уровень осведомленности об аксСпА у врачей смежных специальностей (в

have a different set of symptoms and different rates of progression of axSpA);

- low level of responsibility for one's health;
- low compliance.

It is worth noting that these reasons may overlap with each other, and also have a mutual influence on late diagnosis. Subsequently, patients do not receive optimal treatment and are therefore at risk of deterioration of condition and potential complications [34]. Thus, it is crucial to continue work to identify reliable factors and causes of delayed diagnosis in order to identify errors in the work of medical professionals and further create recommendations for the management such patients.

### THE NEED FOR EARLY DIAGNOSIS AND TREATMENT OF axSpA

As mentioned above, the advanced stage of axSpA implies presence of spinal deformities, which can subsequently lead to structural and functional disorders in the organism. But it is quite difficult to predict in advance how significant the deformities and sagittal imbalance will be in an individual patient.

It is also important to realize that radiological changes in the axial skeleton are formed rather slowly, and several years may pass from the first clinical manifestations to the radiological signs of sacroiliitis, which is one of the reasons for late diagnosis [32]. This, in turn, leads to more significant functional impairment, higher healthcare costs, and poorer quality of life, highlighting the importance of early diagnosis of axSpA [26, 35]. Along with the latter, the question about the feasibility of initiating early therapy for axSpA arises. With the advent of different classes of drugs developed to treat patients with rheumatologic diseases, there is a trend towards timely intervention at reversible stages to potentially prevent the development of functional impairment and radiographic changes. This concept is known as the “window of opportunity” and has been validated in rheumatoid arthritis [36, 37]. However, the application of this concept in early management of patients with axSpA is controversial, which highlighted by recently published reviews [38, 39] that analyzed studies examining the effect of early therapy on the outcomes of axSpA.

First, it is worth noting that in the studies analyzed, the concept “early axSpA” is interpreted differently. And despite the fact that the term “early therapy” is confidently used in the scientific literature, an unambiguous definition of the term “early axSpA” that would be used in research has not existed for a long time [40]. Therefore, the ASAS developed a consensus in 2023, which formulated a definition of

среднем пациенты консультируются у 6–8 специалистов, прежде чем попадают к ревматологу);

3) *персональные* (обусловленные самим пациентом):

- индивидуальные особенности организма, которые сказываются на течении заболевания (у всех пациентов разный набор симптомов и разная скорость прогрессии аксСпА);
- низкий уровень ответственности за свое здоровье;
- низкая комплаентность.

Стоит отметить, что названные причины могут пересекаться друг с другом, а также оказывать взаимное влияние на несвоевременную постановку диагноза. Впоследствии пациенты не получают оптимального лечения и, следовательно, подвержены риску развития ухудшения состояния и потенциальных осложнений [34]. Таким образом, крайне важно продолжать работу по выявлению достоверных факторов и причин поздней диагностики для выявления ошибок в работе медицинских специалистов и дальнейшего создания рекомендаций по работе с такими пациентами.

### НЕОБХОДИМОСТЬ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ И ТЕРАПИИ аксСпА

Как уже было сказано выше, поздняя стадия аксСпА подразумевает под собой наличие деформаций позвоночника, которые впоследствии могут привести к структурным и функциональным нарушениям в организме. Но предположить заранее, насколько выраженными будут деформации и сагиттальный дисбаланс у отдельно взятого пациента, довольно трудно.

Важно также понимать, что рентгенологические изменения в аксиальном скелете формируются довольно медленно, и с момента появления первых клинических проявлений до рентгенологических признаков сакроилиита может пройти несколько лет, что является одной из причин несвоевременной постановки диагноза [32]. Это, в свою очередь, приводит к более значимым функциональным нарушениям, высоким затратам со стороны системы здравоохранения и ухудшению качества жизни, что подчеркивает важность ранней диагностики аксСпА [26, 35]. Наряду с последней встает вопрос о целесообразности инициации ранней терапии при аксСпА. С появлением разных классов лекарственных препаратов, созданных для лечения пациентов с ревматологическими заболеваниями, наблюдается

early axSpA: duration of axial symptoms (cervical/thoracic spine/back/gluteal pain or morning stiffness) is up to 2 years, regardless of the presence or absence of radiological changes [41]. This will allow researchers to design studies correctly, compare the results obtained in relation to early and later stages of the disease, and therefore obtain more reliable data for understanding the effect of early treatment.

Secondly, positive treatment results have been observed only in nr-axSpA with a symptom duration of less than 5 years [39]. However, the fate of these patients with nr-axSpA after treatment is discontinued is unknown. There is evidence that within 2–10 years, nr-axSpA can progress to r-axSpA in 10–40% of cases [42].

Third, although there is no difference in the effect of treating patients with early versus advanced stage axSpA in the reviews presented [38, 39], this does not mean that treating patients at the early stages is no longer necessary. As is known, after diagnosis, the main goal of treatment is to achieve the highest possible quality of life for patients by controlling symptoms and inflammation, preventing progressive structural damage, and maintaining/normalizing body functions [43]. For example, a large Czech study demonstrated the effectiveness of TNF- $\alpha$  inhibitors and the positive effect of therapy on inflammation and disease activity specifically with early intervention [44]. In addition, the quality of life of patients is also affected by fatigue, sleep problems and psychosomatic disorders, the likelihood of which increases with a delayed diagnosis of axSpA [45]. In recent American study further reported the detrimental psychological consequences of late diagnosis in most patients, which could have been avoided with the earlier diagnosis and treatment [46]. However, the potential harm of overdiagnosis and, therefore, inadequate treatment should not be overlooked; therefore, it is important for clinicians to be able to differentiate between other conditions that may present with similar symptoms to axSpA [47].

Thus, the impact of early detection and timely intervention on preventing the development of irreversible structural damage, improving quality of life, and reducing the burden of disease may be crucial in the management of patients with axSpA and should be further researched.

### PROGRESSION OF axSpA TO THE ADVANCED STAGE AND IDENTIFICATION OF POTENTIAL PREDICTORS

As mentioned above, typical for the advanced stage is the process of ankylosing in the axial skele-

тенденция к своевременному вмешательству на обратимых стадиях с целью потенциального предотвращения развития функциональных нарушений и рентгенологических изменений. Данная концепция известна под названием «окно возможностей» и нашла свое подтверждение в отношении ревматоидного артрита [36, 37]. Однако применение этой концепции при ведении пациентов с аксСпА на ранних стадиях является спорным, что подчеркивается в недавно опубликованных обзорах [38, 39], в которых анализировались исследования, посвященные влиянию ранней терапии на исходы аксСпА.

Во-первых, стоит отметить, что в проанализированных исследованиях понятие «ранний аксСпА» трактуется по-разному. И несмотря на то, что термин «ранняя терапия» уверенно употребляется в научной литературе, однозначного определения «ранний аксСпА», которое использовалось бы при проведении исследований, длительное время не существовало [40]. В связи с этим международное общество ASAS в 2023 г. разработало консенсус, в котором сформулировало определение раннего аксСпА: продолжительность аксиальных симптомов (боль в шейном/грудном отделе/спине/ягодицах или утренняя скованность) составляет до 2 лет вне зависимости от наличия или отсутствия рентгенологических изменений [41]. Это позволит ученым грамотно планировать исследования, сравнивать полученные результаты в отношении ранней и более поздней стадий заболевания, а значит, получить более надежные данные для понимания эффекта от раннего лечения.

Во-вторых, положительные результаты терапии наблюдались лишь при нр-аксСпА с длительностью симптомов менее 5 лет [39]. Однако дальнейшая судьба этих пациентов с нр-аксСпА при прекращении лечения неизвестна. Есть данные о том, что в течение 2–10 лет нр-аксСпА может прогрессировать до р-аксСпА в 10–40 % случаев [42].

В-третьих, несмотря на отсутствие различий в эффекте лечения пациентов на ранней и более поздней стадии аксСпА в представленных обзорах [38, 39], это не означает, что лечить пациентов на ранних сроках больше нет необходимости. Как известно, после постановки диагноза основной целью лечения является достижение максимально возможного качества жизни пациентов с помощью контроля симптомов и воспаления, предотвращения прогрессирующих структурных повреждений, а также сохранения/нормализации функций организма [43]. Так, например,

after which the only way to help such patients is surgery, and therefore, modern biologics or targeted drugs are no longer effective in this situation. In turn, there is no data on the incidence of spinal deformities requiring surgical treatment. The progression of the disease is primarily associated with bone tissue proliferation which is manifested by the growth of syndesmophytes and the ankylosing process in the spine and joints. However, it is still unknown what factors lead to the development and progression of disabling changes of the axial skeleton in patients with axSpA. An important problem of advanced axSpA is the lack of clear recommendations on predictors of SpA progression, methods of activity monitoring, highlighting the characteristics of the disease to prevent progression to the surgical stage. However, before talking about potential predictors, it is necessary to focus on the features of the pathophysiological processes of axSpA.

Today, it is believed that the cause of axSpA progression is an osteoproliferative phenomenon, which is characterized by the presence of osteoclastic and osteoblastic mechanisms. One of the most important manifestations of axSpA is bone formation (BF) which is accompanied by the process of bone resorption. Like many inflammatory diseases, in this situation there is an imbalance of these pathophysiological processes, which leads to the appearance of enthesophytes, syndesmophytes, ankylosis and, simultaneously, bone erosions in axSpA [48, 49]. Such predisposition of the skeleton is associated with an abnormal immune response to mechanical stress and associated repetitive tissue microdamage, followed by excessive tissue repair and remodeling [50]. Thus, it is currently believed that BF is an excessive tissue response to mechanical stress and inflammation, as well as an imbalance between activation and inhibition of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway [48, 51]. Wnt/ $\beta$ -catenin pathway signaling is regulated by various inhibitors. The best known are sclerostin and the Dickkopf (Dkk) family of secreted proteins, namely Dkk-1 [52].

Sclerostin, a glycoprotein encoded by the *SOST* gene, is an important protein in the response to mechanical stress, expressed mainly by mature osteocytes, shortens the lifespan of osteoblasts by activating apoptosis, and is a regulator of bone formation by inhibiting the canonical Wnt signaling pathway [52, 53]. Sclerostin reduces the level of osteoprotegerin, which has a catabolic effect through stimulation of the formation and activity of osteoclasts [54]. Various studies have shown that the lower serum sclerostin levels are associated with radiographic progression in patients with axSpA

крупное чешское исследование продемонстрировало эффективность ингибиторов ФНО- $\alpha$  и положительное влияние терапии на воспаление и активность заболевания именно при раннем вмешательстве [44]. Помимо этого, на качество жизни пациентов также влияют утомляемость, проблемы со сном и психосоматические расстройства, вероятность возникновения которых повышается с более запоздалой постановкой диагноза аксСпА [45]. Недавнее американское исследование дополнительно отметило у большинства пациентов пагубные психологические последствия поздней диагностики, которых можно было бы избежать при более ранней постановке диагноза и лечении [46]. Однако не стоит забывать о потенциальном вреде чрезмерной диагностики и, следовательно, неадекватного лечения, поэтому врачам важно уметь дифференцировать другие состояния, которые могут проявляться сходными симптомами с аксСпА [47].

Таким образом, влияние раннего выявления и своевременного вмешательства на предотвращение развития необратимых структурных повреждений, улучшение качества жизни, снижение бремени болезни может иметь решающее значение при ведении пациентов с аксСпА и требует дальнейшего изучения.

### ПРОГРЕССИРОВАНИЕ аксСпА В ПОЗДНЮЮ СТАДИЮ И ВЫДЕЛЕНИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ПРЕДИКТОРОВ

Как уже было сказано выше, типичным для поздней стадии является процесс анкилозирования в аксиальном скелете, по завершении которого единственным способом помочь таким пациентам является хирургическое вмешательство, а значит, современные биологические или таргетные препараты в данной ситуации уже бессильны. В свою очередь, данных о частоте формирования деформаций позвоночника, требующих хирургического лечения, нет. Прогрессирование заболевания первоочередно связано с пролиферацией костной ткани, что проявляется ростом синдесмофитов и процессом анкилозирования позвоночника и суставов. Однако до сих пор неизвестно, какие факторы приводят к развитию и прогрессированию инвалидизирующих изменений аксиального скелета у пациентов с аксСпА. Важной проблемой поздней стадии аксСпА является отсутствие четких рекомендаций по предикторам прогрессирования СпА, методам контроля активности с выделением особенностей течения заболевания для предотвращения

compared with healthy controls [55, 56]. Another potential predictor of progression could be the Dkk-1 protein. It is also an antagonist of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway, is involved in bone formation through the regulation of proliferation and differentiation of osteoblasts and osteoclasts, and also activates sclerostin, inhibiting additionally the Wnt pathway [57]. It is worth noting that the level of Dkk-1 positively correlates with the level of sclerostin and with markers of systemic inflammation (erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein) [58]. In addition, at high levels of Dkk-1, syndesmophytes were not detected and, as a rule, a low mSASSS (modified Stoke Ankylosing Spondylitis Spinal Score) was observed. Thus, in the study by Klingberg et al. [59], AS patients with zero mSASSS had higher Dkk-1 values compared to those with mSASSS >20. In turn, in another German study, a high level of Dkk-1 was a predictor of the absence of syndesmophyte formation [60]. Interesting data regarding Dkk-1 were obtained in a recent study, which has found that patients with axSpA had decreased Dkk-1 expression, but an increased osteoblast activity and mineralization capacity [61]. All these data suggest that the Wnt signaling pathway may contribute to the formation of syndesmophytes in axSpA, and high levels of Dkk-1 and sclerostin, on the contrary, indicate a low probability of ankylosis progression in patients with axSpA.

Adipokine visfatin can be considered as a third potential predictor [62]. It is known that visfatin promotes matrix mineralization of osteoblasts and also suppresses the development of osteoclasts during formation and differentiation [63], which may explain the association observed with radiological progression of AS [64]. Syrbe et al. showed an association of the higher visfatin levels with the worse radiographic mSASSS after 2 years [65]. These results were confirmed in another cohort of patients with AS: changes in visfatin levels were associated with mSASSS progression over 4 years [64]. Thus, it can be assumed that patients prone to progression of axSpA will have low levels of sclerostin and Dkk-1, but high levels of visfatin.

### CONCLUSION

AxSpA, with its diverse clinical picture and not always predictable course, continues to arouse great interest among modern doctors and scientists. Do not forget that this nosology occurs mainly among the working-age population. In delayed diagnosis and the advanced stage, patients are prone to higher disease activity, formation of structural lesion, which can lead to disability, loss of working capacity and

прогрессирования в хирургическую стадию. Однако, прежде чем говорить о потенциальных предикторах, необходимо обратиться к особенностям патофизиологических процессов аксСпА.

На сегодняшний день считается, что причиной прогрессирования аксСпА является остеопролиферативный феномен, который характеризуется наличием остеокластических и остеобластических механизмов. Одним из самых важных проявлений аксСпА является новообразование костной ткани (НОКТ), которое сопровождается процессом костной резорбции. Подобно многим воспалительным заболеваниям, в данной ситуации наблюдается дисбаланс этих патофизиологических процессов, который приводит к появлению энтезофитов, синдесмофитов, анкилоза и одновременно костных эрозий при аксСпА [48, 49]. Такая предрасположенность скелета связана с аномальным иммунным ответом на механический стресс и связанными с ним повторяющимися микроповреждениями тканей, за которыми следуют чрезмерная репарация и ремоделирование тканей [50]. Таким образом, в настоящее время считается, что НОКТ – это чрезмерная реакция тканей на механический стресс и воспаление, а также нарушение баланса между активацией и торможением сигнального пути Wnt/ $\beta$  – катенин [48, 51]. Сигнализация пути Wnt/ $\beta$  – катенин регулируется различными ингибиторами. Наиболее известными являются склеростин и семейство секретируемых белков Dickkopf (Dkk), а именно Dkk-1 [52].

Склеростин – гликопротеин, кодируемый геном *SOST*, является важным белком реакции на механический стресс, экспрессируется в основном зрелыми остеоцитами, сокращает продолжительность жизни остеобластов путем активации апоптоза и является регулятором формирования костной ткани за счет ингибирования канонического Wnt-сигнального пути [52, 53]. Склеростин снижает уровень остеопротегерина, что оказывает катаболическое действие через стимулирование образования и активности остеокластов [54]. Различные исследования показали, что более низкий уровень склеростина в сыворотке крови связан с рентгенографическим прогрессированием у пациентов с аксСпА по сравнению со здоровыми людьми [55, 56]. Другим потенциальным предиктором прогрессирования мог бы стать белок Dkk-1. Он также является антагонистом пути Wnt/ $\beta$  – катенин, участвует в формировании костной ткани через регуляцию пролиферации и дифференцировки остеобластов и остеокластов, а также активирует склеростин, создавая дополни-

тельный ингибирование Wnt-пути [57]. Стоит отметить, что уровень Dkk-1 положительно коррелирует с уровнем склеростина и с маркерами системного воспаления (скорость оседания эритроцитов и С-реактивный белок) [58]. Кроме того, при высоких уровнях Dkk-1 не выявлялись синдесмофиты и, как правило, наблюдался низкий mSASSS (modified Stoke Ankylosing Spondylitis Spinal Score). Так, в исследовании E. Klingberg et al. [59] больные AC с mSASSS, равным 0, имели более высокие показатели Dkk-1 по сравнению с теми, у кого mSASSS был >20. В свою очередь, в другом немецком исследовании высокий уровень Dkk-1 был предиктором отсутствия образования синдесмофитов [60]. Интересные данные относительно Dkk-1 были получены в одном из последних исследований, в котором было обнаружено, что у пациентов с аксСпА снижена экспрессия Dkk-1, но при этом повышена активность остеобластов и способность к минерализации [61]. Все эти данные свидетельствуют о том, что сигнальный путь Wnt может способствовать образованию синдесмофитов при аксСпА, а высокие уровни Dkk-1 и склеростина, наоборот, говорят о низкой вероятности прогрессирования анкилоза у пациентов с аксСпА.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

В качестве третьего потенциального предиктора можно рассмотреть адипокин висфатин [62]. Известно, что висфатин способствует

матричной минерализации остеобластов, а также подавляет развитие остеокластов на стадиях формирования и дифференцировки [63], что может объяснить наблюдаемую связь с рентгенологическим прогрессированием АС [64]. В исследовании U. Sytbe et al. была отмечена связь повышенного уровня висфатина с ухудшением рентгенографического показателя mSASSS через 2 года [65]. Эти результаты были подтверждены при анализе другой когорты пациентов с АС: изменение уровня висфатина было связано с ростом показателя mSASSS на 4 или более пункта в течение 4 лет [64]. Таким образом, можно предположить, что у пациентов, склонных к прогрессированию аксСПА, будут выявлены низкие уровни склеростина и Dkk-1, но при этом высокие показатели висфатина.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Заболевание аксСПА со своей многообразной клинической картиной и не всегда предсказуемым течением продолжает вызывать огромный интерес у врачей и ученых современности. Не стоит забывать, что данная нозология встречается преимущественно среди населения трудоспособного возраста. В случае запоздалой диагностики и формирования поздней стадии пациенты склонны к более высокой активности заболевания, формированию структурных повреж-

дений, которые могут привести к инвалидизации, потере трудоспособности и ухудшению качества жизни. Предпринимаются попытки выделить факторы поздней диагностики, например, такие как женский пол, молодой возраст дебюта заболевания, HLA-B27-отрицательный результат, наличие псориаза, увеита и т.д., однако до сих пор однозначных данных на этот счет нет. Одновременно обсуждается целесообразность ранней диагностики и ранней терапии; для доказательства их положительного влияния на пациентов с аксСПА требуется проведение грамотно спланированных долгосрочных исследований. Также в последнее время довольно часто поднимается вопрос о выявлении потенциальных предикторов прогрессирования аксСПА. Наиболее подходящими кандидатами могли бы стать склеростин, Dkk-1 и висфатин. Разработка параметров, ассоциированных с возможностью использования как потенциальных маркеров прогрессирующего течения СПА в инвалидизирующее состояние, продолжается и требует развития в связи с высокой социальной значимостью аксСПА как заболевания лиц наиболее трудоспособного и детородного возраста.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Khan M.A. Update on spondyloarthropathies // *Ann. Intern. Med.* 2002;136(12):896-907. DOI: 10.7326/0003-4819-136-12-200206180-00011.
2. Rudwaleit M., van der Heijde D., Landewé R. et al. The development of Assessment of SpondyloArthritis international Society classification criteria for axial spondyloarthritis (part II): validation and final selection // *Ann. Rheum. Dis.* 2009;68(6):777-783. DOI: 10.1136/ard.2009.108233.
3. Rudwaleit M., van der Heijde D., Landewé R. et al. The Assessment of SpondyloArthritis International Society classification criteria for peripheral spondyloarthritis and for spondyloarthritis in general // *Ann. Rheum. Dis.* 2011;70(1):25-31. DOI: 10.1136/ard.2010.133645.
4. Шостак Н.А., Правдюк Н.Г. Спондилоартриты: некоторые аспекты патогенеза и диагностики // *Клиницист.* 2019;13(3-4):10-14. DOI: 10.17650/1818-8338-2019-13-3-4-10-14.
5. Rudwaleit M. New approaches to diagnosis and classification of axial and peripheral spondyloarthritis // *Curr. Opin. Rheumatol.* 2010;22(4):375-380. DOI: 10.1097/BOR.0b013e32833ac5cc.
6. Clunie G., Horwood N. Loss and gain of bone in spondyloarthritis: what drives these opposing clinical features? // *Ther. Adv. Musculoskelet. Dis.* 2020;12:1759720X20969260. DOI: 10.1177/1759720X20969260.

## REFERENCES

1. Khan M.A. Update on spondyloarthropathies. *Ann. Intern. Med.* 2002;136(12):896-907. DOI: 10.7326/0003-4819-136-12-200206180-00011.
2. Rudwaleit M., van der Heijde D., Landewé R. et al. The development of Assessment of SpondyloArthritis international Society classification criteria for axial spondyloarthritis (part II): validation and final selection. *Ann. Rheum. Dis.* 2009;68(6):777-783. DOI: 10.1136/ard.2009.108233.
3. Rudwaleit M., van der Heijde D., Landewé R. et al. The Assessment of SpondyloArthritis International Society classification criteria for peripheral spondyloarthritis and for spondyloarthritis in general. *Ann. Rheum. Dis.* 2011;70(1):25-31. DOI: 10.1136/ard.2010.133645.
4. Shostak N.A., Pravdyuk N.G. Spondyloarthritis: aspects of pathogenesis and diagnostics. *Clinician.* 2019;13(3-4):10-14. DOI: 10.17650/1818-8338-2019-13-3-4-10-14. (In Russ.)
5. Rudwaleit M. New approaches to diagnosis and classification of axial and peripheral spondyloarthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 2010;22(4):375-380. DOI: 10.1097/BOR.0b013e32833ac5cc.
6. Clunie G., Horwood N. Loss and gain of bone in spondyloarthritis: what drives these opposing clinical features? *Ther. Adv. Musculoskelet. Dis.* 2020;12:1759720X20969260. DOI: 10.1177/1759720X20969260.

7. Stolwijk C., Boonen A., van Tubergen A., Reveille J.D. Epidemiology of spondyloarthritis // *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 2012;38(3):441-476. DOI: 10.1016/j.rdc.2012.09.003.
  8. Ramiro S., van der Heijde D., van Tubergen A. et al. Higher disease activity leads to more structural damage in the spine in ankylosing spondylitis: 12-year longitudinal data from the OASIS cohort // *Ann. Rheum. Dis.* 2014;73(8):1455-1461. DOI: 10.1136/annrheumdis-2014-205178.
  9. Strand V., Rao A.C., Shillington A.C. et al. Prevalence of axial spondyloarthritis in United States rheumatology practices: Assessment of SpondyloArthritis International Society criteria versus rheumatology expert clinical diagnosis // *Arthritis Care Res. (Hoboken)*. 2013;65(8):1299-1306. DOI: 10.1002/acr.21994.
  10. Costantino F., Talpin A., Said-Nahal R. et al. Prevalence of spondyloarthritis in reference to HLA-B27 in the French population: Results of the GAZEL cohort // *Ann. Rheum. Dis.* 2015;74(4):689-693. DOI: 10.1136/annrheumdis-2013-204436.
  11. Bakland G., Alsing R., Singh K. et al. Assessment of SpondyloArthritis International Society criteria for axial spondyloarthritis in chronic back pain patients with a high prevalence of HLA-B27 // *Arthritis Care Res. (Hoboken)*. 2013;65(3):448-453. DOI: 10.1002/acr.21804.
  12. Ли́ла А.М., Дубинина Т.В., Древал ́ Р.О. и др. Медико-социальная значимость и расчет экономического бремени аксиального спондилоартрита в Российской Федерации // *Современная ревматология*. 2022;16(1):20-25. DOI: 10.14412/1996-7012-2022-1-20-25.
  13. Mease P., Deodhar A. Differentiating nonradiographic axial spondyloarthritis from its mimics: a narrative review // *BMC Musculoskelet. Disord.* 2022;23(1):240. DOI: 10.1186/s12891-022-05073-7.
  14. Alexander M. Ankylosing spondylitis pathogenesis and pathophysiology // *Ankylosing Spondylitis – Recent Concepts* / ed. by J.B. Armas. 2023. DOI: 10.5772/intechopen.109164.
  15. Sieper J., Rudwaleit M., Baraliakos X. et al. The Assessment of SpondyloArthritis international Society (ASAS) handbook: a guide to assess spondyloarthritis // *Ann. Rheum. Dis.* 2009;68(2):ii1-ii44. DOI: 10.1136/ard.2008.104018.
  16. Анкилозирующий спондилит. Клинические рекомендации / Ассоциация ревматологов России. 2018. URL: [https://library.mededtech.ru/rest/documents/cr\\_175/](https://library.mededtech.ru/rest/documents/cr_175/) (дата обращения: 03.06.2024).
  17. Braun J., Sieper J. Ankylosing spondylitis // *Lancet.* 2007;369(9570):1379-1390. DOI: 10.1016/S0140-6736(07)60635-7.
  18. Hu W., Yu J., Liu H. et al. Y shape osteotomy in ankylosing spondylitis, a prospective case series with minimum 2 year follow-up // *PLoS One.* 2016;11(12):e0167792. DOI: 10.1371/journal.pone.0167792.
  19. Chang K.W., Chen Y.Y., Lin C.C. et al. Closing wedge osteotomy versus opening wedge osteotomy in ankylosing spondylitis with thoracolumbar kyphotic deformity // *Spine (Phila Pa 1976)*. 2005;30(14):1584-1593. DOI: 10.1097/01.brs.0000170300.17082.49.
  20. Shin J.K., Lee J.S., Goh T.S., Son S.M. Correlation between clinical outcome and spinopelvic parameters in
7. Stolwijk C., Boonen A., van Tubergen A., Reveille J.D. Epidemiology of spondyloarthritis. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 2012;38(3):441-476. DOI: 10.1016/j.rdc.2012.09.003.
  8. Ramiro S., van der Heijde D., van Tubergen A. et al. Higher disease activity leads to more structural damage in the spine in ankylosing spondylitis: 12-year longitudinal data from the OASIS cohort. *Ann. Rheum. Dis.* 2014;73(8):1455-1461. DOI: 10.1136/annrheumdis-2014-205178.
  9. Strand V., Rao A.C., Shillington A.C. et al. Prevalence of axial spondyloarthritis in United States rheumatology practices: Assessment of SpondyloArthritis International Society criteria versus rheumatology expert clinical diagnosis. *Arthritis Care Res. (Hoboken)*. 2013;65(8):1299-1306. DOI: 10.1002/acr.21994.
  10. Costantino F., Talpin A., Said-Nahal R. et al. Prevalence of spondyloarthritis in reference to HLA-B27 in the French population: Results of the GAZEL cohort. *Ann. Rheum. Dis.* 2015;74(4):689-693. DOI: 10.1136/annrheumdis-2013-204436.
  11. Bakland G., Alsing R., Singh K. et al. Assessment of SpondyloArthritis International Society criteria for axial spondyloarthritis in chronic back pain patients with a high prevalence of HLA-B27. *Arthritis Care Res. (Hoboken)*. 2013;65(3):448-453. DOI: 10.1002/acr.21804.
  12. Lila A.M., Dubinina T.V., Dreval R.O. et al. Medical and social significance and calculation of the economic burden of axial spondyloarthritis in the Russian Federation. *Modern Rheumatology Journal.* 2022;16(1):20-25. DOI: 10.14412/1996-7012-2022-1-20-25. (In Russ.)
  13. Mease P., Deodhar A. Differentiating nonradiographic axial spondyloarthritis from its mimics: a narrative review. *BMC Musculoskelet. Disord.* 2022;23(1):240. DOI: 10.1186/s12891-022-05073-7.
  14. Alexander M. (2023). Ankylosing spondylitis pathogenesis and pathophysiology. In Armas J.G. (ed.) *Ankylosing spondylitis – Recent Concepts*. DOI: 10.5772/intechopen.109164.
  15. Sieper J., Rudwaleit M., Baraliakos X. et al. The Assessment of SpondyloArthritis international Society (ASAS) handbook: a guide to assess spondyloarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 2009;68 Suppl 2:ii1-ii44. DOI: 10.1136/ard.2008.104018.
  16. Ankylosing spondylitis. Clinical recommendations / Association of Rheumatologists of Russia. 2018. URL: [https://library.mededtech.ru/rest/documents/cr\\_175/](https://library.mededtech.ru/rest/documents/cr_175/) (accessed 03.06.2024).
  17. Braun J., Sieper J. Ankylosing spondylitis. *Lancet.* 2007;369(9570):1379-1390. DOI: 10.1016/S0140-6736(07)60635-7.
  18. Hu W., Yu J., Liu H. et al. Y shape osteotomy in ankylosing spondylitis, a prospective case series with minimum 2 year follow-up. *PLoS One.* 2016;11(12):e0167792. DOI: 10.1371/journal.pone.0167792.
  19. Chang K.W., Chen Y.Y., Lin C.C. et al. Closing wedge osteotomy versus opening wedge osteotomy in ankylosing spondylitis with thoracolumbar kyphotic deformity. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2005;30(14):1584-1593. DOI: 10.1097/01.brs.0000170300.17082.49.
  20. Shin J.K., Lee J.S., Goh T.S., Son S.M. Correlation between clinical outcome and spinopelvic parameters in

- ankylosing spondylitis // *Eur. Spine J.* 2014;23(1):242-247. DOI: 10.1007/s00586-013-2929-8.
21. Klassen A.F., Miller A., Fine S. Health-related quality of life in children and adolescents who have a diagnosis of attention-deficit/hyperactivity disorder // *Pediatrics.* 2004;114(5):e541-e547. DOI: 10.1542/peds.2004-0844.
  22. Nikiphorou E., Ramiro S. Work disability in axial spondyloarthritis // *Curr. Rheumatol. Rep.* 2020;22(9):55. DOI: 10.1007/s11926-020-00932-5.
  23. Волнухин Е.В., Галушко Е.А., Бочкова А.Г. и др. Клиническое многообразие анкилозирующего спондилита в реальной практике врача-ревматолога в России (часть 1) // *Научно-практическая ревматология.* 2012;50(2):44-49. DOI: 10.14412/1995-4484-2012-1272.
  24. Подряднова М.В., Балабанова Р.М., Урумова М.М., Эрдес Ш.Ф. Взаимосвязь клинических характеристик анкилозирующего спондилита с трудоспособностью и производительностью труда // *Научно-практическая ревматология.* 2014;52(5):513-519. DOI: 10.14412/1995-4484-2014-513-519.
  25. Лила А.М., Древал Р.О., Шипицын В.В. Оценка организации медицинской помощи и лекарственного обеспечения при ревматических заболеваниях и социально-экономического бремени этих болезней в Российской Федерации // *Современная ревматология.* 2018;12(3):112-119. DOI: 10.14412/1996-7012-2018-3-112-119.
  26. Yi E., Ahuja A., Rajput T. et al. Clinical, economic, and humanistic burden associated with delayed diagnosis of axial spondyloarthritis: a systematic review // *Rheumatol. Ther.* 2020;7(1):65-87. DOI: 10.1007/s40744-020-00194-8.
  27. Feldtkeller E., Khan M.A., van der Heijde D. et al. Age at disease onset and diagnosis delay in HLA-B27 negative vs. positive patients with ankylosing spondylitis // *Rheumatol. Int.* 2003;23(2):61-66. DOI: 10.1007/s00296-002-0237-4.
  28. Garrido-Cumbrera M., Navarro-Compán V., Bundy C. et al. Identifying parameters associated with delayed diagnosis in axial spondyloarthritis: data from the European map of axial spondyloarthritis // *Rheumatology (Oxford).* 2022;61(2):705-712. DOI: 10.1093/rheumatology/keab369.
  29. Hay C.A., Packham J., Ryan S., Mallen C.D. et al. Diagnostic delay in axial spondyloarthritis: a systematic review // *Clin. Rheumatol.* 2022;41(7):1939-1950. DOI: 10.1007/s10067-022-06100-7.
  30. Лапшина С.А., Мясоутова Л.И., Мухина Р.Г., Салихов И.Г. Результативность образовательных программ по раннему выявлению анкилозирующего спондилита для врачей первичного звена в г. Казани // *Научно-практическая ревматология.* 2014;52(2):183-186. DOI: 10.14412/1995-4484-2014-183-186.
  31. Redeker I., Callhoff J., Hoffmann F. et al. Determinants of diagnostic delay in axial spondyloarthritis: an analysis based on linked claims and patient-reported survey data // *Rheumatology (Oxford).* 2019;58(9):1634-1638. DOI: 10.1093/rheumatology/kez090.
  32. Румянцева Д.Г., Эрдес Ш.Ф. Аксиальный спондилоартрит: современный взгляд на концепцию и эволюцию болезни // *Современная ревматология.* in ankylosing spondylitis. *Eur. Spine J.* 2014;23(1):242-247. DOI: 10.1007/s00586-013-2929-8.
  21. Klassen A.F., Miller A., Fine S. Health-related quality of life in children and adolescents who have a diagnosis of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Pediatrics.* 2004;114(5):e541-e547. DOI: 10.1542/peds.2004-0844.
  22. Nikiphorou E., Ramiro S. Work disability in axial spondyloarthritis. *Curr. Rheumatol. Rep.* 2020;22(9):55. DOI: 10.1007/s11926-020-00932-5.
  23. Volnukhin E.V., Galushko E.A., Bochkova A.G. et al. Clinical diversity of ankylosing spondylitis in the real practice of a rheumatologist in Russia (Part I). *Rheumatology Science and Practice.* 2012;50(2):44-49. DOI: 10.14412/1995-4484-2012-1272. (In Russ.)
  24. Podryadnova M.V., Balabanova R.M., Urumova M.M., Erdes Sh.F. Correlation between clinical characteristics of ankylosing spondylitis and work capacity and productivity. *Rheumatology Science and Practice.* 2014;52(5):513-519. DOI: 10.14412/1995-4484-2014-513-519. (In Russ.)
  25. Lila A.M., Dreval R.O., Shipitsyn V.V. Assessment of organization of medical care and drug provision for patients with rheumatic diseases, and the socioeconomic burden of these diseases in the Russian Federation. *Modern Rheumatology Journal.* 2018;12(3):112-119. DOI: 10.14412/1996-7012-2018-3-112-119. (In Russ.)
  26. Yi E., Ahuja A., Rajput T. et al. Clinical, economic, and humanistic burden associated with delayed diagnosis of axial spondyloarthritis: a systematic review. *Rheumatol. Ther.* 2020;7(1):65-87. DOI: 10.1007/s40744-020-00194-8.
  27. Feldtkeller E., Khan M.A., van der Heijde D. et al. Age at disease onset and diagnosis delay in HLA-B27 negative vs. positive patients with ankylosing spondylitis. *Rheumatol. Int.* 2003;23(2):61-66. DOI: 10.1007/s00296-002-0237-4.
  28. Garrido-Cumbrera M., Navarro-Compán V., Bundy C. et al. Identifying parameters associated with delayed diagnosis in axial spondyloarthritis: data from the European map of axial spondyloarthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2022;61(2):705-712. DOI: 10.1093/rheumatology/keab369.
  29. Hay C.A., Packham J., Ryan S., Mallen C.D. et al. Diagnostic delay in axial spondyloarthritis: a systematic review. *Clin. Rheumatol.* 2022;41(7):1939-1950. DOI: 10.1007/s10067-022-06100-7.
  30. Lapshina S.A., Myasoutova L.I., Mukhina R.G., Salikhov I.G. Effectiveness of educational programs on early diagnosis of ankylosing spondylitis for primary care physicians in Kazan. *Rheumatology Science and Practice.* 2014;52(2):183-186. DOI: 10.14412/1995-4484-2014-183-186. (In Russ.)
  31. Redeker I., Callhoff J., Hoffmann F., et al. Determinants of diagnostic delay in axial spondyloarthritis: an analysis based on linked claims and patient-reported survey data. *Rheumatology (Oxford).* 2019;58(9):1634-1638. DOI: 10.1093/rheumatology/kez090.
  32. Rumyantseva D.G., Erdes Sh.F. Axial spondyloarthritis: a current look at the concept and evolution of the disease. *Modern Rheumatology Journal.* 2019;13(4):4-10. DOI: 10.14412/1996-7012-2019-4-4-10. (In Russ.)

- 2019;13(4):4-10. DOI: 10.14412/1996-7012-2019-4-4-10.
33. Дубинина Т.В., Эрдес Ш.Ф. Причины поздней диагностики анкилозирующего спондилита в клинической практике // Научно-практическая ревматология. 2010;48(2):43-48. DOI: 10.14412/1995-4484-2010-1415.
  34. Barnett R., Ingram T., Sengupta R. Axial spondyloarthritis 10 years on: still looking for the lost tribe // *Rheumatology (Oxford)*. 2020;59(14):iv25-iv37. DOI: 10.1093/rheumatology/keaa472.
  35. Mennini F.S., Viti R., Marcellusi A. et al. Economic evaluation of spondyloarthritis: economic impact of diagnostic delay in Italy // *Clinicoecon. Outcomes Res.* 2018;10:45-51. DOI: 10.2147/CEOR.S144209.
  36. van Nies J.A.B., Krabben A., Schoones J.W. et al. What is the evidence for the presence of a therapeutic window of opportunity in rheumatoid arthritis? A systematic literature review // *Ann. Rheum. Dis.* 2014;73(5):861-870. DOI: 10.1136/annrheumdis-2012-203130.
  37. Burgers L.E., Raza K., Van Der Helm-Van Mil A.H. Window of opportunity in rheumatoid arthritis-Definitions and supporting evidence: From old to new perspectives // *RMD Open*. 2019;5(1):e000870. DOI: 10.1136/rmdopen-2018-000870.
  38. Benavent D., Capelusnik D., Ramiro S. et al. Looking through the window of opportunity in axial spondyloarthritis? // *Joint Bone Spine*. 2023;90(6):105603. DOI: 10.1016/j.jbspin.2023.105603.
  39. Capelusnik D., Benavent D., van der Heijde D. et al. Treating spondyloarthritis early: does it matter? Results from a systematic literature review // *Rheumatology (Oxford)*. 2023;62(4):1398-1409. DOI: 10.1093/rheumatology/keac532.
  40. Benavent D., Capelusnik D., van der Heijde D. et al. How is early spondyloarthritis defined in the literature? Results from a systematic review // *Semin. Arthritis Rheum.* 2022;55:152032. DOI: 10.1016/j.semarthrit.2022.152032.
  41. Navarro-Compán V., Benavent D., Capelusnik D. et al. ASAS consensus definition of early axial spondyloarthritis // *Ann. Rheum. Dis.* 2023;ard-2023-224232. DOI: 10.1136/ard-2023-224232.
  42. Protopopov M., Poddubnyy D. Radiographic progression in non-radiographic axial spondyloarthritis // *Expert Rev. Clin. Immunol.* 2018;14(6):525-533. DOI: 10.1080/1744666X.2018.1477591.
  43. Ramiro S., Nikiphorou E., Sepriano A. et al. ASAS-EULAR recommendations for the management of axial spondyloarthritis: 2022 update // *Ann. Rheum. Dis.* 2022;82(1):19-34. DOI: 10.1136/ard-2022-223296.
  44. Milota T., Hurnakova J., Pavelka K. et al. Delayed treatment with a tumor necrosis factor alpha blocker associated with worse outcomes in patients with spondyloarthritis: data from the Czech National Registry ATTRA // *Ther. Adv. Musculoskelet. Dis.* 2022;14:1759720X221081649. DOI: 10.1177/1759720X221081649.
  45. Ogdie A., Benjamin Nowell W., Reynolds R. et al. Real-world patient experience on the path to diagnosis of ankylosing spondylitis // *Rheumatol. Ther.* 2019;6(2):255-267. DOI: 10.1007/s40744-019-0153-7.
  46. Dube C.E., Lapane K.L., Ferrucci K.A. et al. Personal experiences with diagnostic delay among axial spondyloarthritis patients: a qualitative study. *Rheumatol. Ther.* 2021;8(2):1015-1030. DOI: 10.1007/s40744-019-0153-7.
  33. Dubinina T.V., Erdes Sh.F. Reasons for late diagnosis of ankylosing spondylitis in clinical practice. *Rheumatology Science and Practice*. 2010;48(2):43-48. DOI: 10.14412/1995-4484-2010-1415. (In Russ.)
  34. Barnett R., Ingram T., Sengupta R. Axial spondyloarthritis 10 years on: still looking for the lost tribe. *Rheumatology (Oxford)*. 2020;59(Suppl4):iv25-iv37. DOI: 10.1093/rheumatology/keaa472.
  35. Mennini F.S., Viti R., Marcellusi A. et al. Economic evaluation of spondyloarthritis: economic impact of diagnostic delay in Italy. *Clinicoecon. Outcomes Res.* 2018;10:45-51. DOI: 10.2147/CEOR.S144209.
  36. van Nies J.A.B., Krabben A., Schoones J.W. et al. What is the evidence for the presence of a therapeutic window of opportunity in rheumatoid arthritis? A systematic literature review. *Ann. Rheum. Dis.* 2014;73(5):861-870. DOI: 10.1136/annrheumdis-2012-203130.
  37. Burgers L.E., Raza K., Van Der Helm-Van Mil A.H. Window of opportunity in rheumatoid arthritis-Definitions and supporting evidence: From old to new perspectives. *RMD Open*. 2019;5(1):e000870. DOI: 10.1136/rmdopen-2018-000870.
  38. Benavent D., Capelusnik D., Ramiro S. et al. Looking through the window of opportunity in axial spondyloarthritis? *Joint Bone Spine*. 2023;90(6):105603. DOI: 10.1016/j.jbspin.2023.105603.
  39. Capelusnik D., Benavent D., van der Heijde D. et al. Treating spondyloarthritis early: does it matter? Results from a systematic literature review. *Rheumatology (Oxford)*. 2023;62(4):1398-1409. DOI: 10.1093/rheumatology/keac532.
  40. Benavent D., Capelusnik D., van der Heijde D. et al. How is early spondyloarthritis defined in the literature? Results from a systematic review. *Semin. Arthritis Rheum.* 2022;55:152032. DOI: 10.1016/j.semarthrit.2022.152032.
  41. Navarro-Compán V., Benavent D., Capelusnik D. et al. ASAS consensus definition of early axial spondyloarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 2023;ard-2023-224232. DOI: 10.1136/ard-2023-224232.
  42. Protopopov M., Poddubnyy D. Radiographic progression in non-radiographic axial spondyloarthritis. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 2018;14(6):525-533. DOI: 10.1080/1744666X.2018.1477591.
  43. Ramiro S., Nikiphorou E., Sepriano A. et al. ASAS-EULAR recommendations for the management of axial spondyloarthritis: 2022 update. *Ann. Rheum. Dis.* 2022;82(1):19-34. DOI: 10.1136/ard-2022-223296.
  44. Milota T., Hurnakova J., Pavelka K. et al. Delayed treatment with a tumor necrosis factor alpha blocker associated with worse outcomes in patients with spondyloarthritis: data from the Czech National Registry ATTRA. *Ther. Adv. Musculoskelet. Dis.* 2022;14:1759720X221081649. DOI: 10.1177/1759720X221081649.
  45. Ogdie A., Benjamin Nowell W., Reynolds R. et al. Real-world patient experience on the path to diagnosis of ankylosing spondylitis. *Rheumatol. Ther.* 2019;6(2):255-267. DOI: 10.1007/s40744-019-0153-7.
  46. Dube C.E., Lapane K.L., Ferrucci K.A. et al. Personal experiences with diagnostic delay among axial spondyloarthritis patients: a qualitative study. *Rheumatol. Ther.* 2021;8(2):1015-1030. DOI: 10.1007/s40744-019-0153-7.

- loarthritis patients: a qualitative study // *Rheumatol. Ther.* 2021;8(2):1015-1030. DOI: 10.1007/s40744-019-0153-7.
47. Landewé R.B.M. Overdiagnosis and overtreatment in rheumatology: a little caution is in order // *Ann. Rheum. Dis.* 2018;77(10):1394-1396. DOI: 10.1136/annrheumdis-2018-213700.
  48. Эрдес Ш.Ф., Коротаева Т.В. Прогрессирование аксиального спондилоартрита // *Современная ревматология.* 2021;15(3):7-14. DOI: 10.14412/1996-7012-2021-3-7-14.
  49. Rossini M., Viapiana O., Adami S. et al. Focal bone involvement in inflammatory arthritis: the role of IL17 // *Rheumatol Int.* 2016;36(4):469-482. DOI: 10.1007/s00296-015-3387-x.
  50. McGonagle D., Stockwin L., Isaaks J., Emery P. An enthesitis based model for the pathogenesis of spondyloarthropathy. Additive effects of microbial adjuvant and biomechanical factors at disease sites // *J. Rheumatol.* 2001;28(10):2155-2159.
  51. Delgado-Calle J., Sato A.Y., Bellido T. Role and mechanism of action of sclerostin in bone // *Bone.* 2017;96:29-37. DOI: 10.1016/j.bone.2016.10.007.
  52. Baron R., Rawadi G. Targeting the Wnt/beta-catenin pathway to regulate bone formation in the adult skeleton // *Endocrinology.* 2007;148(6):2635-2643. DOI: 10.1210/en.2007-0270.
  53. Omran A., Atanasova D., Landgren F., Magnusson P. Sclerostin: from molecule to clinical biomarker // *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23(9):4751. DOI: 10.3390/ijms23094751.
  54. Ito N., Prideaux M., Wijenayaka A.R. et al. Sclerostin directly stimulates osteocyte synthesis of fibroblast growth factor-23 // *Calcif Tissue Int.* 2021;109(1):66-76. DOI: 10.1007/s00223-021-00823-6.
  55. Perrotta F.M., Ceccarelli F., Barbati C. et al. Serum sclerostin as a possible biomarker in ankylosing spondylitis: a case-control study // *J. Immunol. Res.* 2018;2018:9101964. DOI: 10.1155/2018/9101964.
  56. Appel H., Ruiz-Heiland G., Listing J. et al. Altered skeletal expression of sclerostin and its link to radiographic progression in ankylosing spondylitis // *Arthritis Rheum.* 2009;60(11):3257-3262. DOI: 10.1002/art.24888.
  57. Wu M., Chen M., Yang J. et al. Dickkopf-1 in ankylosing spondylitis: Review and meta-analysis // *Clin. Chim. Acta.* 2018;481:177-183. DOI: 10.1016/j.cca.2018.03.010.
  58. Sakellariou G.T., Iliopoulos A., Konsta M. et al. Serum levels of Dkk-1, sclerostin and VEGF in patients with ankylosing spondylitis and their association with smoking, and clinical, inflammatory and radiographic parameters. // *Joint Bone Spine.* 2017;84(3):309-315. DOI: 10.1016/j.jbspin.2016.05.008.
  59. Klingberg E., Nurkkala M., Carlsten H., Forsblad-d'Elia H. Biomarkers of bone metabolism in ankylosing spondylitis in relation to osteoproliferation and osteoporosis // *J. Rheumatol.* 2014;41(7):1349-1356. DOI: 10.3899/jrheum.131199.
  60. Heiland G.R., Appel H., Poddubnyy D. et al. High level of functional dickkopf-1 predicts protection from syndesmophyte formation in patients with ankylosing spondylitis // *Ann. Rheum. Dis.* 2012;71(4):572-574. DOI: 10.1136/annrheumdis-2011-200216.
  47. Landewé R.B.M. Overdiagnosis and overtreatment in rheumatology: a little caution is in order. *Ann. Rheum. Dis.* 2018;77(10):1394-1396. DOI: 10.1136/annrheumdis-2018-213700.
  48. Erdes Sh.F., Korotaeva T.V. Progression of axial spondyloarthritis. *Modern Rheumatology Journal.* 2021;15(3):7-14. DOI: 10.14412/1996-7012-2021-3-7-14. (In Russ.)
  49. Rossini M., Viapiana O., Adami S. et al. Focal bone involvement in inflammatory arthritis: the role of IL17. *Rheumatol Int.* 2016;36(4):469-482. DOI: 10.1007/s00296-015-3387-x.
  50. McGonagle D., Stockwin L., Isaaks J., Emery P. An enthesitis based model for the pathogenesis of spondyloarthropathy. Additive effects of microbial adjuvant and biomechanical factors at disease sites. *J. Rheumatol.* 2001;28(10):2155-2159.
  51. Delgado-Calle J., Sato A.Y., Bellido T. Role and mechanism of action of sclerostin in bone. *Bone.* 2017;96:29-37. DOI: 10.1016/j.bone.2016.10.007.
  52. Baron R., Rawadi G. Targeting the Wnt/beta-catenin pathway to regulate bone formation in the adult skeleton. *Endocrinology.* 2007;148(6):2635-2643. DOI: 10.1210/en.2007-0270.
  53. Omran A., Atanasova D., Landgren F., Magnusson P. Sclerostin: from molecule to clinical biomarker. *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23(9):4751. DOI: 10.3390/ijms23094751.
  54. Ito N., Prideaux M., Wijenayaka A.R. et al. Sclerostin directly stimulates osteocyte synthesis of fibroblast growth factor-23. *Calcif Tissue Int.* 2021;109(1):66-76. DOI: 10.1007/s00223-021-00823-6.
  55. Perrotta F.M., Ceccarelli F., Barbati C. et al. Serum sclerostin as a possible biomarker in ankylosing spondylitis: a case-control study. *J. Immunol. Res.* 2018;2018:9101964. DOI: 10.1155/2018/9101964.
  56. Appel H., Ruiz-Heiland G., Listing J. et al. Altered skeletal expression of sclerostin and its link to radiographic progression in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* 2009;60(11):3257-3262. DOI:10.1002/art.24888.
  57. Wu M., Chen M., Yang J. et al. Dickkopf-1 in ankylosing spondylitis: Review and meta-analysis. *Clin. Chim. Acta.* 2018;481:177-183. DOI: 10.1016/j.cca.2018.03.010.
  58. Sakellariou G.T., Iliopoulos A., Konsta M. et al. Serum levels of Dkk-1, sclerostin and VEGF in patients with ankylosing spondylitis and their association with smoking, and clinical, inflammatory and radiographic parameters. *Joint Bone Spine.* 2017;84(3):309-315. DOI: 10.1016/j.jbspin.2016.05.008.
  59. Klingberg E., Nurkkala M., Carlsten H., Forsblad-d'Elia H. Biomarkers of bone metabolism in ankylosing spondylitis in relation to osteoproliferation and osteoporosis. *J. Rheumatol.* 2014;41(7):1349-1356. DOI: 10.3899/jrheum.131199.
  60. Heiland G.R., Appel H., Poddubnyy D. et al. High level of functional dickkopf-1 predicts protection from syndesmophyte formation in patients with ankylosing spondylitis. *Ann. Rheum. Dis.* 2012;71(4):572-574. DOI: 10.1136/annrheumdis-2011-200216.
  61. Daoussis D., Kanellou A., Panagiotopoulos E., Papatheou D. DKK-1 is underexpressed in mesenchymal stem cells from patients with ankylosing spondylitis

61. Daoussis D., Kanellou A., Panagiotopoulos E., Papanichou D. DKK-1 is underexpressed in mesenchymal stem cells from patients with ankylosing spondylitis and further downregulated by IL-17 // *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23(12):6660. DOI: 10.3390/ijms23126660.
62. Toussiro E. The influence of adipokines on radiographic damage in inflammatory rheumatic diseases // *Biomedicines.* 2023;11(2):536. DOI: 10.3390/biomedicines11020536.
63. Moschen A.R., Geiger S., Gerner R., Tilg H. Pre-B cell colony enhancing factor/NAMPT/visfatin and its role in inflammation-related bone disease // *Mutat. Res.* 2010;690(1-2):95-101. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2009.06.012.
64. Rademacher J., Siderius M., Gellert L. et al. Baseline serum biomarkers of inflammation, bone turnover and adipokines predict spinal radiographic progression in ankylosing spondylitis patients on TNF inhibitor therapy // *Semin. Arthritis Rheum.* 2022;53:151974. DOI: 10.1016/j.semarthrit.2022.151974.
65. Syrbe U., Callhoff J., Conrad K. et al. Serum adipokine levels in patients with ankylosing spondylitis and their relationship to clinical parameters and radiographic spinal progression // *Arthritis Rheumatol.* 2015;67(3):678-685. DOI: 10.1002/art.38968.
- and further downregulated by IL-17. *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23(12):6660. DOI: 10.3390/ijms23126660.
62. Toussiro E. The Influence of adipokines on radiographic damage in inflammatory rheumatic diseases. *Biomedicines.* 2023;11(2):536. DOI: 10.3390/biomedicines11020536.
63. Moschen A.R., Geiger S., Gerner R., Tilg H. Pre-B cell colony enhancing factor/NAMPT/visfatin and its role in inflammation-related bone disease. *Mutat. Res.* 2010;690(1-2):95-101. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2009.06.012.
64. Rademacher J., Siderius M., Gellert L. et al. Baseline serum biomarkers of inflammation, bone turnover and adipokines predict spinal radiographic progression in ankylosing spondylitis patients on TNF inhibitor therapy. *Semin. Arthritis Rheum.* 2022;53:151974. DOI: 10.1016/j.semarthrit.2022.151974.
65. Syrbe U., Callhoff J., Conrad K. et al. Serum adipokine levels in patients with ankylosing spondylitis and their relationship to clinical parameters and radiographic spinal progression. *Arthritis Rheumatol.* 2015;67(3):678-685. DOI: 10.1002/art.38968.

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

**Зонова Елена Владимировна** – д-р мед. наук, профессор кафедры терапии, гематологии и трансфузиологии ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0001-8529-4105.

**Юшина Елена Сергеевна** – аспирант кафедры терапии, гематологии и трансфузиологии ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0001-7781-3593.

## ABOUT THE AUTHORS

**Elena V. Zonova** – Dr. Sci. (Med.), Professor, Department of Therapy, Hematology and Transfusiology, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0001-8529-4105.

**Elena S. Yushina** – Post-graduate Student, Department of Therapy, Hematology and Transfusiology, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0001-7781-3593.

---

## ТРЕБОВАНИЯ К ПРЕДОСТАВЛЕНИЮ МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ ПУБЛИКАЦИИ В JOURNAL OF SIBERIAN MEDICAL SCIENCES

---

В Journal of Siberian Medical Sciences (далее — JSMS) публикуются научные обзоры и статьи по медицинским наукам, подготовленные по материалам оригинальных научных исследований. JSMS выходит 4 раза в год.

Требования, предъявляемые к публикациям в JSMS, сформулированы с учетом требований, предъявляемых к рецензируемым научным изданиям, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук.

Статьи, отправленные авторами в другие издания и/или напечатанные ранее в них, к опубликованию не принимаются.

При описании научно-исследовательских клинических работ с привлечением человека в качестве объекта исследования авторы должны указать, соответствовали ли они международным и российским законодательным актам о юридических и этических принципах медико-биологических исследований такого рода. Не допускается использование фамилий, инициалов больных и номеров историй болезни. При описании экспериментов на животных необходимо указать, соответствовало ли содержание и использование лабораторных животных правилам, принятым в учреждении, рекомендациям национального совета по исследованиям, национальным законам.

Авторские права соблюдаются в соответствии с Гражданским кодексом Российской Федерации (ч. 4) и другими действующими нормативными документами. Авторы несут полную ответственность за содержание статей.

В редакцию JSMS авторы должны предоставить:

1) *электронную версию статьи*, подготовленную в соответствии с требованиями к оформлению статей, изложенными ниже;

2) *оригинал статьи* в печатном виде с указанием города, даты, фамилии с подписью каждого автора (на последней странице), визой «В печать» и подписью (на первой странице) заведующего кафедрой или иного должностного лица организации, на базе которой выполнено исследование. Авторы предоставляют статьи в редакцию лично или по почте;

3) *согласие* на публикацию статьи в JSMS и обработку персональных данных авторов (заполняется каждым автором) (см. на сайте НГМУ: [https://jsms.ngmu.ru/zayavlenie\\_jsms.doc](https://jsms.ngmu.ru/zayavlenie_jsms.doc));

4) для сотрудников ФГБОУ ВО НГМУ Минздрава России (далее — НГМУ) — *экспертное заключение* отдела координации федеральных программ, конкурсных проектов и инновационного развития управления по науке, инновациям и информатизации НГМУ (см. [www.ngmu.ru](http://www.ngmu.ru)); для сторонних авторов — *направление на опубликование* на фирменном бланке организации, на базе которой выполнено оригинальное научное исследование, за подписью ответственного должностного лица.

### ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ РУКОПИСЕЙ

1. Текст статьи набирается в текстовом редакторе Microsoft Word, Open Office и др., все поля 2 см, шрифт Times New Roman, кегль 12, межстрочный интервал 1,5. Текст статьи необходимо направить в редакцию JSMS в виде отдельного файла с указанием ФИО первого автора — Иванов И.И. текст.doc. Допускается отправка файлов в форматах doc, docx.

2. ФИО авторов набирается строчными буквами курсивом на русском языке. Инициалы помещаются перед фамилией автора. Порядок, в котором будут указаны авторы, определяется их совместным решением.

3. Город и название мест работы авторов оформляются строчными буквами курсивом на русском языке.

4. Статья должна содержать аннотацию на русском языке. В аннотации должны быть изложены цели исследования, основные процедуры, результаты оригинальных исследований и выводы. Под аннотацией помещается подзаголовок «Ключевые слова», после него до 10 ключевых слов или коротких фраз, которые будут способствовать правильному индексированию статьи в поисковых системах и системах цитирования. Аннотацию необходимо направить в редакцию JSMS вместе с текстом статьи в виде отдельного файла с указанием ФИО первого автора — Иванов И.И. аннотация.doc. Также предо-

ставляются сведения о каждом из авторов: фамилия, имя, отчество (полностью на русском языке и в транслитерации), ученые звания и ученая степень, должность, место работы, рабочий телефон и адрес электронной почты (e-mail). Сведения необходимы для обработки публикаций в базе данных Российского индекса научного цитирования и других системах цитирования. Аннотация, ключевые слова, информация об авторах и название учреждений должны быть также предоставлены на английском языке.

5. Таблицы помещаются в текст статьи. Таблицы должны быть пронумерованы последовательно в соответствии с порядком, в котором они упоминаются в тексте (например, табл. 1, табл. 2 и т. д.).

6. Рисунки вставляются в текст статьи, а также предоставляются в виде отдельных пронумерованных файлов формата .jpg или .gif с разрешением не менее 300 dpi. Рисунки должны быть контрастными и четкими, буквы, цифры и символы на них должны быть различимы. Рисунками считаются графики, рентгенограммы, фотографии или любые другие графические объекты. Фотографии людей не должны быть узнаваемыми, либо к ним должно быть приложено письменное разрешение на их публикацию. Рисунки должны быть пронумерованы последовательно в соответствии с порядком, в котором они впервые упоминаются в тексте — рис. 1, рис. 2 и т. д. Подписи размещаются в тексте под рисунками. В подписях к микрофотографиям указывается степень увеличения и способ окраски.

7. В тексте статьи используются следующие заголовки: введение, цель исследования, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, список литературы.

8. Используются только стандартные общепринятые сокращения (аббревиатуры). Не применяются сокращения в названии статьи. Полный термин, вместо которого вводится сокращение, должен предшествовать первому использованию этого сокращения в тексте.

9. Обязательно наличие списка литературы. Библиографические ссылки в тексте статьи даются арабскими цифрами в квадратных скобках, в полном соответствии с нумерацией списка литературы. Ссылки в тексте статьи должны даваться последовательно по возрастанию: [1]..[2]... [3]... и т.д. Развернутое описание источника в списке литературы предоставляются по ГОСТ 7.0.5-2008. Список литературы должен содержать публикации за последние 5 лет. В списке литературы все информационные источники перечисляются в порядке их цитирования.

10. Редакция JSMS берет на себя присвоение каждой публикуемой статье номера УДК и осуществление полного перевода статьи на английский язык.

11. Статьи, не соответствующие указанным редакцией требованиям, к опубликованию не принимаются.

## **ПОРЯДОК РЕЦЕНЗИРОВАНИЯ РУКОПИСЕЙ, ПРИНИМАЕМЫХ ДЛЯ ПУБЛИКАЦИИ**

1. Рукописи статей, поступивших в редакцию, направляются для рецензирования членам редакционного совета с целью их экспертной оценки на предмет соответствия требованиям JSMS и Высшей аттестационной комиссии при Министерстве образования и науки РФ.

Рецензенты уведомляются о том, что в целях обеспечения авторских и других неимущественных прав присланные рукописи не подлежат разглашению, копированию, распространению. Рецензирование проводится анонимно.

При отказе в направлении на рецензирование представленной автором рукописи редакция направляет автору мотивированный ответ в электронном виде.

Редакция журнала по письменному запросу направляет авторам рецензии на поступившие материалы в электронном виде. Авторы обязаны учесть замечания рецензентов и внести в статью соответствующие исправления или предоставить мотивированный ответ о несогласии с замечаниями рецензента.

Редакционная коллегия принимает решение о возможности публикации статьи или отклоняет ее по результатам рецензирования.

Рецензии хранятся в редакции журнала в течение 5 лет с момента публикации.

2. Редакцией не допускаются к публикации:

— статьи, тематика которых не соответствует научному направлению журнала;

— статьи, авторы которых отказываются от технической доработки статей;

— статьи, авторы которых не внесли конструктивные замечания рецензента в текст статьи и не предоставили мотивированный ответ о несогласии с замечаниями рецензента.

В случае отклонения статьи редакция направляет автору мотивированный отказ. Редакция JSMS не хранит рукописи, не принятые к печати. Рукописи, принятые к публикации, не возвращаются.