



www.reanimatology.com
ISSN 1813-9779 (print)
ISSN 2411-7110 (online)

ОБЩАЯ РЕАНИМАТОЛОГИЯ GENERAL REANIMATOLOGY

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ
Scientific-and-Practical Journal

Том 15

Volume 15

№ 6

Москва
Moscow
2019

Информация для авторов

Уважаемые авторы!

Обращаем Ваше внимание на обязательные с 2020 года разделы статей:

1 — Конфликт интересов.

2 — Вклад авторов в подготовку публикации.

3 — Информация об авторах.

Пожалуйста, располагайте разделы 1 и 2 в конце статьи, перед списком литературы.

Раздел 3 будет расположен на сайте журнала: www.reanimatology.com

В разделе 1 авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов или о его возможных причинах.

В разделе 2 авторы указывают форму участия каждого автора в подготовке публикации (включая этап проведения исследования).

В разделе 3 для каждого автора необходимо указать Ф.И.О. (полностью), место работы (полностью, с указанием города и страны), должность, ученую степень, e-mail, SPIN код e-library, один (по выбору) или все цифровые идентификаторы в международных наукометрических базах данных (ORCID ID, ResearcherID, SCOPUS ID).

Уважаемые авторы!

С целью повышения качества контента журнала «Общая реаниматология» в 2020 году рукописи в формате «обзор» принимаются только по заказу редакции.

Information for Authors

Dear Authors!

We draw Your attention to the mandatory sections of articles from 2020:

1 — Conflict of interest.

2 — Contribution of the authors to the preparation of the publication.

3 — Information about the authors.

Please place sections 1 and 2 at the end of the article before the list of references.

Section 3 would be located on the journal's website: www.reanimatology.com

In section 1, the authors declare that there is no conflict of interest or disclose possible causes of the latter.

In section 2, the authors disclose the form of participation of each author in the preparation of the publication (including the stage of the study).

In section 3 we ask to specify the Full Name including surname, first name and second name (if applicable), affiliation with the organization (in full, please include the city and country), position, academic degree, e-mail, digital identifier from any of 3 or all scientometric databases: ORCID ID, ResearcherID or Scopus ID.

Dear authors!

In order to improve the quality of the content of the journal «General reanimatology» in 2020, manuscripts in the «review» format are accepted only by order of the editorial team.

ОБЩАЯ РЕАНИМАТОЛОГИЯ

научно-практический рецензируемый журнал

- охватывает вопросы медицины критических состояний
- публикует рукописи на русском и английском языках бесплатно
- включен в базы данных SCOPUS (с 2015 г.), РИНЦ (Российский Индекс научного цитирования), RSCI на платформе WoS CA и др. базы данных; Перечень изданий, рекомендованных ВАК для публикации результатов диссертационных работ

РЕДАКТОРЫ

В. В. МОРОЗ, главный редактор, член-корр. РАН, профессор, ФНКЦ реаниматологии и реабилитологии (г. Москва, Россия)

Г. А. РЯБОВ, зам. главного редактора, академик РАН, профессор, НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского ФНКЦ реаниматологии и реабилитологии (г. Москва, Россия)

А. М. ГОЛУБЕВ, зам. главного редактора, д.м.н., профессор, ФНКЦ реаниматологии и реабилитологии (г. Москва, Россия)

Д. А. ОСТАПЧЕНКО, научный редактор, д.м.н., Городская клиническая больница №1 им. Н. И. Пирогова (г. Москва, Россия)

В. М. ПИСАРЕВ, научный редактор, д.м.н., профессор, НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского ФНКЦ реаниматологии и реабилитологии (г. Москва, Россия)

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

А. БАКУРИДЗЕ, д. фарм. наук, профессор, Государственный медицинский университет (г. Тбилиси, Грузия)

С. БАРАМИ, профессор, Международное общество по изучению шока, Институт экспериментальной и клинической травматологии им. Л. Больцмана (г. Вена, Австрия)

И. Г. БОБРИНСКАЯ, д.м.н., профессор (г. Москва, Россия)

Л. БОССАРТ, профессор, Консультативный комитет Европейского совета по реанимации (г. Антверпен, Бельгия)

Г. А. БОЯРИНОВ, д.м.н., профессор, Нижегородская государственная медицинская академия (Россия)

А. А. БУНЯТЯН, академик РАН, профессор, Научный центр хирургии им. Б. В. Петровского, Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова (Россия)

Ж.-Л. ВИНСЕНТ, профессор, Больница Эрасме Университет Либре (г. Брюссель, Бельгия)

Г. В. ГВАК, д.м.н., Областная детская клиническая больница (г. Иркутск, Россия)

Г. А. ГОРОДНИК, д.м.н., профессор, Национальный медицинский университет им. М. Горького, Донецкое клиническое территориальное медицинское объединение (Украина)

А. В. ГРЕЧКО, член-корр. РАН, профессор, ФНКЦ реаниматологии и реабилитологии (г. Москва, Россия)

Е. В. ГРИГОРЬЕВ, д.м.н., профессор, НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний СО РАН (г. Кемерово, Россия)

А. И. ГРИЦАН, д.м.н., профессор, Красноярский государственный медицинский университет (Россия)

В. Т. ДОЛГИХ, д.м.н., профессор, НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского ФНКЦ реаниматологии и реабилитологии (г. Москва, Россия)

И. Б. ЗАБОЛОТСКИХ, д.м.н., профессор, Кубанский государственный медицинский университет (г. Краснодар, Россия)

М. Н. ЗАМЯТИН, д.м.н., профессор, Институт усовершенствования врачей Национального медико-хирургического центра им. Н. И. Пирогова (г. Москва, Россия)

В. Л. ЗЕЛЬМАН, академик РАН, профессор, Медицинская школа Keck (г. Лос Анджелес, США)

Ж.-М. КАВАЙОН, Европейское общество по изучению шока, Институт Пастера (г. Париж, Франция)

GENERAL REANIMATOLOGY

Scientific-and-Practical Peer-Reviewed Journal

- It is covering questions of medicine of critical states
- Manuscripts in Russian and English are published free-of-charge
- It is indexed in SCOPUS (Since 2015), PIHLI, RSCI (Russian Science Citation Index, WoS CA), it is included in the Supreme Certifying Commission List of Russian periodical and research issues in which the publication of Postgraduate education works (PhD, DSc) are recommended

EDITORS

Viktor V. MOROZ, Editor-in-Chief, MD, PhD, DSc, Professor, Corr. Member of RAS, Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitation (Moscow, Russia)

Gennady A. RYABOV, Deputy Editor-in-Chief, MD, PhD, DSc, Professor, Member of RAS, V. A. Negovsky Scientific Research Institute of General Reanimatology, Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitation (Moscow, Russia)

Arkady M. GOLUBEV, Deputy Editor-in-Chief, MD, PhD, DSc, Professor, Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitation (Moscow, Russia)

Dmitry A. OSTAPCHENKO, Scientific Editor, MD, PhD, DSc, N. I. Pirogov Moscow City Hospital №1 (Moscow, Russia)

Vladimir M. PISAREV, Scientific Editor, MD, PhD, DSc, Professor, V. A. Negovsky Scientific Research Institute of General Reanimatology, Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitation (Moscow, Russia)

EDITORIAL BOARD

Aliosha BAKURIDZE, Professor, PhD, Tbilisi State Medical University (Georgia)

Soheyl BAHRAMI, Professor, PhD, The International Federation of Shock Society (IFSS), Ludwig Boltzmann Institute of Experimental and Clinical Traumatology (Vienna, Austria)

Irina G. BOBRINSKAYA, MD, PhD, DSc, Professor (Moscow, Russia)

Leo L. BOSSAERT, MD, Professor, Board of Advisory Committee, European Resuscitation Council University of Antwerpen (Belgium)

Gennady A. BOYARINOV, MD, PhD, DSc, Professor, Nizhniy Novgorod State Medical Academy (Nizhniy Novgorod, Russia)

Armen A. BUNYATYAN, MD, PhD, DSc, Professor, Member of RAS, B. V. Petrovsky Russian Research Surgical Center, I. M. Sechenov 1st Moscow State Medical University (Moscow, Russia)

Jean-Louis VINCENT, Professor, Erasme Hospital, Universite Libre de Bruxelles (Belgium)

Gennady V. GVAK, MD, PhD, DSc, Regional Children Hospital (Irkutsk, Russia)

Georgy A. GORODNIK, DSc, Professor, Corr. Member of RAS, M. Gorky National Medical University; Donetsk Territorial Medical Association (Ukraine)

Andrey V. GRECHKO, PhD, DSc, Professor, Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitation (Moscow, Russia)

Evgeny V. GRIGORYEV, MD, PhD, DSc, Professor, Research Scientific Institute of Clinical Studies of complex problems of cardiovascular diseases, Siberian Branch, RAS (Kemerovo, Russia)

Alexey I. GRITSAN, MD, PhD, DSc, Professor, Krasnoyarsk State Medical University (Krasnoyarsk, Russia)

Vladimir T. DOLGIH, MD, PhD, DSc, Professor, V. A. Negovsky Scientific Research Institute of General Reanimatology, Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitation (Moscow, Russia)

Igor B. ZABOLOTSKIY, MD, PhD, DSc, Professor, Kuban State Medical University (Krasnodar, Russia)

Michael N. ZAMYATIN, MD, PhD, DSc, Professor, Institute of Advanced Medical Studies, N. I. Pirogov National Medical Surgery Center (Moscow, Russia)

Vladimir L. ZELMAN, Member of RAS, Professor, Keck School of Medicine (Los Angeles, USA)

Н. А. КАРПУН, д.м.н., Городская клиническая больница № 68 (г. Москва, Россия)

И. А. КОЗЛОВ, д.м.н., профессор, Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М. Ф. Владимирского (г. Москва, Россия)

П. КОХАНЕК, профессор, Центр исследований проблем реаниматологии им. П. Сафара, Университет Питтсбурга (США)

А. Н. КУЗОВЛЕВ, д.м.н., НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского Федерального научно-клинического центра реаниматологии и реабилитологии (г. Москва, Россия)

Г. А. ЛИВАНОВ, д.м.н., профессор, НИИ скорой медицинской помощи им. И. И. Джанелидзе (г. С.-Петербург, Россия)

В. В. ЛИХВАНЦЕВ, д.м.н., профессор, Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М. Ф. Владимирского (г. Москва, Россия)

Д. П. НОЛАН, профессор, Королевский объединенный госпиталь (г. Бат, Великобритания)

И. Ф. ОСТРЕЙКОВ, профессор, Российская медицинская академия непрерывного последипломного образования (г. Москва)

В. И. РЕШЕТНЯК, д.м.н., профессор, Московский государственный медико-стоматологический университет (Россия)

Д. М. САБИРОВ, д.м.н., профессор, Ташкентский институт усовершенствования врачей (Узбекистан)

Е. А. СПИРИДОНОВА, д.м.н., профессор, Национальный научно-практический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева (г. Москва, Россия)

Н. Д. УШАКОВА, д.м.н., профессор, Научно-исследовательский онкологический институт (г. Ростов-на-Дону, Россия)

А. М. ХАДЖИБАЕВ, д.м.н., профессор, Республиканский научный центр экстренной медицинской помощи (г. Ташкент, Узбекистан)

С. Е. ХОРОШИЛОВ, д.м.н., Главный военный клинический госпиталь им. Н. Н. Бурденко (г. Москва, Россия)

А. М. ЧЕРНЫШ, д.м.н., профессор, НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского ФНКЦ реаниматологии и реабилитологии (г. Москва, Россия)

Ю. Л. ШЕВЧЕНКО, академик РАН, профессор, Национальный медико-хирургического центр им. Н. И. Пирогова (г. Москва, Россия)

И. В. ЯРЕМА, член-корр. РАН, профессор, Московский государственный медико-стоматологический университет (Россия)

Технический секретарь Н. В. Голубева

Свидетельство о регистрации: ПИ № ФС77-18690 от 02 ноября 2004 г. Печатное издание журнал «Общая реаниматология» зарегистрирован Федеральной службой по надзору за соблюдением законодательства в сфере массовых коммуникаций и охране культурного наследия.

Периодичность: 6 раз в год

Учредитель: © Фонд «Медицина критических состояний»

Издатель: Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии, Москва, Россия

Оригинал-макет: Н. В. Голубева

Верстка: С. В. Шишков

Типография: «Advanced Solutions», 119071, г. Москва, Ленинский пр-т, д. 19, стр. 1. E-mail: om@aov.ru

Контакты с редакцией: Россия, 107031, г. Москва, ул. Петровка, 25, стр. 2. Тел.: +7-495-650-25-20; +7-495-694-17-73. E-mail: journal_or@mail.ru; сайт: www.reanimatology.com

Подписка и распространение: индекс издания по каталогу «Книга-Сервис» — 46338. Цена свободная

Подписано в печать: 16.12.2019

Jean-Marc CAVAILLON, DSc, European Shock Society (ESS), Institute Pasteur (Paris, France)

Nikolai A. KARPUN, MD, PhD, DSc, City Hospital № 68 (Moscow, Russia)

Igor A. KOZLOV, MD, PhD, DSc, Professor, M. F. Vladimirsky Moscow Regional Research Clinical Institute (Moscow, Russia)

Patrick M. KOCHANNEK, MD, FCCM, Professor, P. Safar Center for Resuscitation Research, University of Pittsburgh School of Medicine (USA)

Artem N. KUZOVLEV, MD, DSc, V. A. Negovsky Research Institute of Reanimatology, Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitology (Moscow, Russia)

Georgiy A. LIVANOV, MD, PhD, DSc, Professor, I. I. Dzhanelidze Institute of Emergency Medical Care (St. Petersburg, Russia)

Valery V. LIKHVANTSEV, MD, PhD, DSc, Professor, M. F. Vladimirsky Moscow Region Clinical Research Institute (Moscow, Russia)

Jerry P. NOLAN, Professor, Royal United Hospital (Bath, UK)

Ivan F. OSTREYKOV, MD, PhD, DSc, Professor, Medical Academy of Continuous Postgraduate Education, (Moscow, Russia)

Vasily I. RESHETNYAK, MD, PhD, DSc, Professor, Moscow Medical Dental University (Russia)

Djurabay M. SABIROV, DSc, Professor, Tashkent Institute of Postgraduate Medical Education (Tashkent, Uzbekistan)

Elena A. SPIRIDONOVA, MD, PhD, DSc, Professor, D. Rogachev National Scientific Practical Centre of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology (Moscow, Russia)

Natalia D. USHAKOVA, MD, PhD, DSc, Professor, Rostov Cancer Research Institute, (Rostov-on-Don, Russia)

Abdukhakim M. KHADJIBAIEV, MD, Professor, Republican Research Center of Emergency Medicine, (Tashkent, Uzbekistan)

Sergey E. KHOROSHILOV, MD, PhD, DSc., N. N. Burdenko Main Clinical Military Hospital, Russian Ministry of Defence (Moscow, Russia)

Alexander M. CHERNYSH, PhD, DS., Professor, V. A. Negovsky Scientific Research Institute of General Reanimatology, Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitology (Moscow, Russia)

Yury L. SHEVCHENKO, MD, PhD, DS., Professor, Member of RAS, N. I. Pirogov National Medical Surgical Center (Moscow, Russia)

Ivan V. YAREMA, MD, PhD, DSc., Professor, Corr. Member of RAS, Moscow Medical Dental University (Moscow, Russia)

Technical Secretary: Natalia V. Golubeva

Registration certificate of the Journal «Obshchaya reanimatologiya» (General Reanimatology): ПИ № ФС77-18690, November 2, 2004, Federal Service for Supervision of Compliance with Legislation in the Sphere of Mass Communications and Protection of Cultural Heritage

Publication Frequency: 6 numbers per year.

Founder: © «Emergency Medicine» Fund

Publisher: Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitology, Moscow, Russia

Artwork: Natalia V. Golubeva

Page-proof: Sergey V. Shishkov

Printing House: «Advanced Solutions» 19, Leninsky Prospekt, Build. 1, Moscow 119071, Russia, E-mail: om@aov.ru

Contacts: 25 Petrovka Str., Build. 2, Moscow 107031, Russia. Tel. +7-495-650-25-20; +7-495-694-17-73; E-mail: journal_or@mail.ru; сайт: www.reanimatology.com

Subscription: Index 46338, refer to catalog of «Книга-Сервис»

Signed for printing: 16.12.2019

СОДЕРЖАНИЕ

CONTENTS

КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ
И ПРАКТИКАCLINICAL STUDIES
AND PRACTICE

- Оценка влияния однонуклеотидного полиморфизма val158met гена катехол-О-метилтрансферазы (COMT) на эффективность спинальной аналгезии в 1 сутки после лапароскопических операций по поводу колоректального рака (пилотное исследование)
А. Л. Потапов, Д. В. Земскова, Т. И. Иванова, В. А. Хорохорина, П. В. Шегай, С. А. Иванов, А. Д. Каприн
- Дефекты мембран эритроцитов у пациентов с нарушениями функции головного мозга (пилотное исследование)
А. В. Гречко, И. В. Молчанов, В. А. Сергунова, Е. К. Козлова, А. М. Черныш
- Первое успешное внедрение семейно-ориентированной медицинской помощи в отделении интенсивной терапии детского стационара Республики Казахстан (сообщение)
А. И. Сапаров, В. Г. Сазонов, З. С. Тобылбаева, Г. Б. Карина, М. Н. Курочкин, Д. К. Беремжанова, А. З. Мустафа

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

EXPERIMENTAL STUDIES

- Глиоцитоархитектоника зубчатой фасции и поля СА4 гиппокампа головного мозга белых крыс после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий
А. В. Горбунова, Д. Б. Авдеев, С. С. Степанов, В. А. Акулинин, А. С. Степанов, А. Ю. Шоронова, А. А. Самсонов
- Эпикардальная трансплантация пластов из мезенхимальных стромальных клеток жировой клетчатки способствует активации эпикарда и стимулирует ангиогенез при инфаркте миокарда (экспериментальное исследование)
К. В. Дергилев, З. И. Цоколаева, И. Б. Белоглазова, А. В. Комова, С. В. Павлова, Д. О. Трактыев, Е. В. Парфенова

ОБЗОРЫ

REVIEWS

- Лазер-индуцированная флуоресцентная спектроскопия в диагностике тканевой гипоксии (обзор)
А. С. Бабкина
- Метаболизм микробиоты при критических состояниях (обзор и постулаты)
Н. В. Белобородова
- Заболевания печени и гемостаз (обзор)
Часть II. Холестатические заболевания печени и гемостаз
В. И. Решетняк, И. В. Маев, Т. М. Решетняк, С. В. Журавель, В. М. Писарев
- Механизмы нейропротекции при церебральной гипотермии (обзор)
О. А. Шевелев, М. В. Петрова, Ш. Х. Саидов, Н. А. Ходорович, П. Прадхан

Оценка влияния однонуклеотидного полиморфизма *val158met* гена катехол-О-метилтрансферазы (*COMT*) на эффективность спинальной аналгезии в 1 сутки после лапароскопических операций по поводу колоректального рака (пилотное исследование)

А. Л. Потапов, Д. В. Земскова, Т. И. Иванова,
В. А. Хорохорина, П. В. Шегай, С. А. Иванов, А. Д. Каприн

Медицинский радиологический научный центр им. А. Ф. Цыба — филиал
Национального медицинского исследовательского радиологического центра Минздрава России,
Россия, 249036, г. Обнинск, ул. Королева, д. 4

COMT val158met Polymorphism and Spinal Analgesia Efficacy of Laparoscopic Surgery for Colorectal Cancer (a Pilot Study)

Alexander L. Potapov, Daria V. Zemskova, Tatiana I. Ivanova, Vera A. Khorokhorina,
Peter V. Shegay, Sergey A. Ivanov, Andrey D. Kaprin

A. F. Tsyba Medical Radiological Research Center, National Medical Radiological Research Center, Ministry of Health of Russia,
4 Korolev Str., 249036 Obninsk, Russia

Цель: оценка влияния SNP val158met гена *COMT* на эффективность спинальной аналгезии в 1 сутки после лапароскопических операций по поводу колоректального рака.

Материал и методы. В пилотном исследовании, включавшем 100 пациентов с колоректальным раком, оперированных лапароскопическим доступом, с использованием в комплексе анестезиологического пособия спинальной аналгезии (10–12,5 мг бупивакаина + 200 мкг морфина), оценили частоту полиморфизма val158met гена *COMT*, интенсивность боли в 1 сутки после операции, частоту и выраженность тошноты, рвоты, кожного зуда, потребность в дополнительном обезболивании.

Результаты. Распределение частот аллелей val/val (25%), val/met (45%) и met/met (30%) подчинялось закону Харди-Вайнберга ($\chi^2=0,96$; $p>0,05$) и статистически значимо не отличалось от группы здоровых доноров. В группах носителей различных аллелей SNP val158met исследуемые показатели статистически значимо не отличались.

Заключение. Зависимости эффективности спинальной аналгезии в 1 сутки после лапароскопических операций по поводу колоректального рака от SNP val158met гена *COMT* не выявили. Для получения окончательных выводов необходимо проведение дальнейших исследований.

Ключевые слова: хирургия; колоректальный рак; спинальная аналгезия; катехол-О-метилтрансфераза; полиморфизм

The aim: To assess the effect of *COMT* G1947A genetic polymorphism (val158met) on the efficacy of spinal analgesia on day 1 after laparoscopic surgery for colorectal cancer.

Material and methods. In a pilot study involving 100 patients with colorectal cancer, operated through laparoscopic access, using spinal analgesia (10.0–12.5 mg of bupivacaine + 200 mcg of morphine), the frequency of *COMT* gene G1947A (val158met) polymorphism, the intensity of pain on day 1 after surgery, the frequency and severity of nausea, vomiting, skin itching, the need for additional analgesia have been assessed.

Results. The frequency distribution of alleles val/val (25%), val/met (45%) and met/met (30%) was consisted with Hardy-Weinberg equilibrium ($\chi^2=0.96$; $P>0.05$) and was not significantly different from the healthy donor group. In the groups of patients with various *COMT* alleles of val158met polymorphism, the studied parameters also did not differ significantly.

Conclusion. Study did not find significant link between spinal analgesia efficacy on day 1 after laparoscopic surgery for colorectal cancer and *COMT* rs4680 G1947A (val158met) polymorphism. Further research to enhance the power of the study is warranted to reach the final conclusions.

Keywords: surgery; colorectal cancer; spinal analgesia; Catechol-O-methyltransferase (*COMT*); polymorphism

DOI:10.15360/1813-9779-2019-6-4-10

Адресс для корреспонденции:

Александр Леонидович Потапов
E-mail: ALP8@yandex.ru

Correspondence to:

Alexander L. Potapov
E-mail: ALP8@yandex.ru

Введение

Эффективность периперационной анальгезии подвержена выраженным индивидуальным колебаниям, которые могут быть связаны не только с особенностями операции и применяемых методов обезболивания, но также имеют генетическую природу. В настоящее время описан ряд генетических факторов, способных влиять на перцепцию боли, фармакодинамику и фармакокинетику препаратов для анальгезии [1–3]. Одним из них является точечный полиморфизм (single nucleotide polymorphism – SNP) val158met (rs4680) гена катехол-О-метилтрансферазы (*COMT*), связанный со значительными изменениями активности данного фермента. Одной из функций *COMT* является метаболизм катехоламинов в синапсах ЦНС, поэтому логично предположить, что изменение ее активности может влиять на пути передачи и модуляции ноцицептивных сигналов, которые являются норадреналин-, допамин- и серотонинэргическими [4].

В анестезиологии изучение SNP val158met гена *COMT* ведется преимущественно в связи с системной анальгезией наркотическими анальгетиками [5–9]. Сведений о влиянии данного полиморфизма на эффективность регионарных методов анальгезии в доступной литературе найти не удалось. Мы предполагаем, что проведение исследований в этом направлении может иметь научно-практическое значение по нескольким причинам. Во-первых, применение регионарной анальгезии является основополагающим методом контроля боли при некоторых видах операций, например, в хирургии толстой кишки [10]. Во-вторых, при нейроаксиальных методах обезболивания используются не только местные анестетики, но и адъюванты, в том числе наркотические анальгетики [4]. Наконец, проверка гипотезы о влиянии SNP val158met гена *COMT* на качество регионарной анальгезии позволит подтвердить или опровергнуть целесообразность продолжения исследований в данном направлении.

Целью настоящего пилотного исследования является оценка влияния SNP val158met гена *COMT* на эффективность спинальной анальгезии в 1 сутки после лапароскопических операций по поводу колоректального рака

Материал и методы

Исследование являлось пилотным и носило когортный обсервационный характер, одобрено этическим комитетом МРНЦ им. А. Ф. Цыба — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» МЗ РФ (протокол №194 от 18.01.2017). Все пациенты подписали информированное согласие на участие и забор генетического материала. В исследование включили 100

Introduction

The efficacy of perioperative analgesia may significantly vary between individuals, which can be due not only to the type of surgery and used analgesia, but also to genetic causes. Currently, a number of genetic factors affecting pain perception, pharmacodynamics and pharmacokinetics of analgesic drugs have been described [1–3]. One of them is the catechol-O-methyltransferase (*COMT*) gene (rs4680) single nucleotide polymorphism (SNP), associated with significant changes in the activity of this enzyme. One of the *COMT* functions is the metabolism of catecholamines in CNS synapses; therefore, it is reasonable to suggest that the change in its activity may affect the transmission and modulation of nociceptive signals, mediated by norepinephrine, dopamine, and serotonin [4].

In anesthesiology, *COMT* val158met polymorphism has been studied mainly in connection with systemic analgesia with narcotic analgesics [5–9]. There is no data on the impact of this polymorphism on the efficacy of regional analgesia in the available literature. We suggest that research in this area may be of scientific and practical importance for several reasons. First, regional analgesia is a fundamental way to control pain in some types of surgical operations, for example, in colon surgery [10]. Second, in neuraxial pain management, not only local anesthetics, but also adjuvants are used, including narcotic analgesics [4]. Finally, testing the hypothesis of the effect of the *COMT* G1947A (val158met) polymorphism on the quality of regional analgesia will confirm or disprove the need for further research in this area.

The purpose of this pilot study was to evaluate the effect of *COMT* G1947A SNP on the efficacy of spinal analgesia on day 1 after laparoscopic surgery for colorectal cancer.

Materials and Methods

This was a pilot cohort observational study, approved by the Ethics Committee of the A. Tsyb Medical Radiological Research Center (A. Tsyb MRRC) which is a branch of the National Medical Research Radiological Center of the Ministry of Health of the Russian Federation (Protocol No. 194 of 18.01.2017). All patients signed an informed consent for participation and collection of genetic material. The study included 100 patients after laparoscopic surgery for colorectal cancer between January 2017 and June 2018 (Table 1) and 100 clinically healthy donors.

Patient management was based on the rapid rehabilitation protocol [10]. All surgeries were performed under general anesthesia (sevoflurane + fentanyl) with muscle relaxants and the use of ventilation. Prior to the general anesthesia induction, a subarachnoid space puncture was performed at the level of LII-III and 10–12.5 mg of bupivacaine hydrochloride with 200 µg of morphine hydrochloride were injected. Postoperative analgesia in the groups was based on the numeric rating scale

Таблица 1. Клиническая характеристика обследованных пациентов и сведения о выполненных операциях.
Table 1. Clinical parameters of the studied patients and information about the performed surgery.

Parameters	Value of parameters
Total patients, <i>n</i>	100
Age, years (<i>M±m</i>)	61.1±1.04
Sex, m/f	50/50
ASA class*	II–III
Duration of surgery, min (<i>M±m</i>)	181.4±8.0
Phentanyl dose during surger, mcg (<i>M±m</i>)	350±14.0
Anterior resection of the rectum	40
Sigmoid resection	19
Right hemicolectomy	18
Left hemicolectomy	8
Reconstructive surgery	7
Rectal extirpation	4
Recurrent pelvic tumors	4

Note. * ASA — American Society of Anesthesiologists scale for functional status assessment.

Примечание. Для табл. 1, 3, 4: parameters — параметры; value of — значения; total patients — всего пациентов; age, years — возраст, годы; sex, m/f — пол, м/ж; duration of surgery — длительность операции; phentanyl dose during surger — доза фентанила во время операции; anterior resection of the rectum — передняя резекция прямой кишки; sigmoid resection — резекция сигмовидной кишки; right/left hemicolectomy — правосторонняя/левосторонняя гемиколэктомия; reconstructive surgery — восстановительные операции; rectal extirpation — экстирпация прямой кишки; recurrent pelvic tumors — рецидивные опухоли тазовой локализации. * — ASA — шкала функционального статуса Американской ассоциации анестезиологов.

пациентов колоректальным раком, прооперированных лапароскопическим доступом с января 2017 по июнь 2018 года (табл. 1) и 100 клинически здоровых доноров.

Ведение пациентов осуществляли с использованием протокола ускоренной реабилитации [10]. Все операции выполняли под общей анестезией (севофлоран + фентанил) с миорелаксантами и ИВЛ. Перед индукцией в общую анестезию на уровне II–III выполняли пункцию субарахноидального пространства и вводили 10–12,5 мг бупивакаина гидрохлорида с добавлением 200 мкг морфина гидрохлорида. Послеоперационную аналгезию в группах осуществляли на основании цифровой рейтинговой шкалы (ЦРШ) интенсивности боли. При ЦРШ > 3 баллов выполняли инъекцию 30 мг кеторолака трометамин в/в, при отсутствии эффекта — тримеперидин 20 мг в/м. Первую вертикализацию пациентов осуществляли через 6–8 часов после операции.

В 1 сутки после операции при помощи ЦРШ в баллах от 0 до 10 оценивали максимальную интенсивность боли в покое (ЦРШ₁), интенсивность боли при первой вертикализации (ЦРШ₂), частоту и выраженность тошноты (ЦРШ₃), частоту и выраженность кожного зуда (ЦРШ₄), частоту рвоты. Оценивали также потребление в дополнительном обезболивании в течение первых суток послеоперационного периода (НПВС, опиоиды).

В качестве генетического материала использовали ДНК клеток периферической венозной крови, которую брали в вакутейнеры с этилендиаминуксусной калиевой солью (K2ЭДТА) и хранили при температуре –20°C. Геномную ДНК выделяли с помощью набора «Wizard Genomic DNA Purification Kit» («Promega») в соответствии с протоколом производителя. Использовали методику полимеразной цепной реакции с последующей обработкой специфической рестриктазой Hsp92II («Promega») и определением длины фрагментов рестрикции (ПЦР/ПДРФ). Для амплификации фрагмента *COMT*, содержащего исследуемый SNP, использовали праймеры 5'-ACTGTGGCTACTCAGCTGTG

(NRS) of pain intensity. If NRS score was >3 points, 30 mg of ketorolac tromethamine IV was injected, if no effect was observed, 20 mg trimeperidine IM were given. The first patient verticalization was done in 6–8 hours after the operation.

On day 1 after surgery the maximum intensity of pain at rest (NRS₁), the pain intensity at first verticalization (NRS₂), the frequency and severity of nausea (NRS₃), the frequency and severity of itching (NRS₄), the frequency and severity of itching, and the frequency of vomiting were assessed in points from 0 to 10 according to the NRS. The need for additional analgesia (NSAIDs, opioids) during the first 24 hours of the postoperative period was also assessed.

The DNA of peripheral venous blood cells was used as a genetic material. The blood was drawn into vacutainers with dipotassium ethylenediamine tetraacetic acid (K2EDTA) and stored at a temperature of –20°C. Genomic DNA was isolated using the «Wizard Genomic DNA Purification Kit» («Promega») in accordance with the manufacturer's protocol. The polymerase chain reaction technique with subsequent treatment with specific restrictionase Hsp92II («Promega») and determination of restriction fragments length (PCR/RFLP) was used. The 5'-ACTGTGCTACTCAGCTGGTG (direct) and 5'-CCTTTTTCAGGCTGACAAA (reverse, Eurogen) primers were used to amplify the *COMT* fragment containing the studied SNP [11].

The statistical data analysis was done using STATISTICA 6.0 software. The main array of the obtained data had a distribution distinct from the normal one (Shapiro–Wilk test), therefore, non-parametric χ^2 criterion and single-factor dispersion analysis (ANOVA Kruskal–Wallis) were used. All data, except for those specifically noted, are presented as median (Me) and values of quartiles II and III (QII–QIII). Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$.

Results and Discussion

The gene encoding the structure and function of *COMT* is localized on the chromosome 22

Таблица 2. Частота SNP val158met гена COMT.
Table 2. Frequency of COMT val158met SNP.

Group	SNP, %			Hardy-Weinberg distribution, χ^2
	val/val	val/met	met/met	
Patients $n=100$	25	45	30	0.96; $P>0.05$
Donors $n=100$	28	51	21	0.06; $P>0.05$

Примечание. Для табл. 2–4: group — группа; patients — пациенты; donors — доноры; Hardy-Weinberg distribution — распределение Харди-Вайнберга.

(прямой) и 5'-CCTTTTCCAGGTCTGACAA (обратный, «Евроген») [11].

Статистическую обработку данных проводили при помощи программы STATISTICA 6.0. Основной массив полученных данных имел распределение отличное от нормального (критерий Shapiro-Wilk), поэтому использовали непараметрические критерии χ^2 и однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA Kruskal-Wallis). Все данные, за исключением особо отмеченных, представлены в виде медианы (Me), а также значений II и III квартилей (QII-QIII). Различия считали статистически значимыми при $p<0,05$.

Результаты и обсуждение

Ген, кодирующий структуру и функцию COMT, локализован на хромосоме 22q11.21 и состоит из 6 экзонов. SNP rs4680 является транзицией гуанина на аденин в нуклеотидной последовательности четвертого экзона (G1947A). Это приводит к замене валина на метионин в позиции 158 аминокислотной последовательности белковой структуры фермента (val158met) и снижению его активности в 3–4 раза у гомозиготных носителей мутантной аллели met/met. Повышение содержания дофамина в синапсах приводит к изменению активности β -адренергических рецепторов, концентрации энкефалина и плотности опиоидных рецепторов в ЦНС [1, 8].

Нами были идентифицированы все три возможных комбинации SNP val158met гена COMT. Распределение аллелей подчинялось закону Харди-Вайнберга. Это свидетельствует о том, что обследованные популяции близки к идеальным и не находились под влиянием каких-либо неучтенных факторов. Статистически значимых различий частот аллелей между группами пациентов и доноров не обнаружили (табл. 2).

Одним из критериев качества анальгезии является частота таких побочных эффектов, как тошнота, рвота и кожный зуд, который особенно актуален при нейроаксиальном применении морфина. Мы оценили частоту данных неблагоприятных событий, а также потребность в дополнительном обезболивании в группах носителей различных аллелей val158met и не выявили статистически значимых различий (табл. 3).

Главным показателем эффективности послеоперационной анальгезии является выраженность боли в покое и при активизации, а

(22q11.21) and includes 6 exons. SNP rs4680 is a guanine to adenine transition in the nucleotide sequence of the fourth exon (G1947A). This leads to the replacement of valine with methionine in position 158 of the amino acid sequence of the enzyme protein structure (val158met) and a 3–4-fold decrease in its activity in homozygous carriers of the met/met mutant allele. An increase in the dopamine content in synapses leads to changes in β -adrenergic receptor activity, enkephalin concentration, and opioid receptor density in the CNS [1, 8].

We identified all three possible combinations of COMT val158met SNP. The distribution of alleles conformed to the Hardy-Weinberg equilibrium which suggests that the populations studied were close to ideal and not affected by any non-recorded factors. No statistically significant differences in allele frequencies between patient groups and donors were found (Table 2).

One of the criteria for quality analgesia is the frequency of side effects such as nausea, vomiting and itching, which is particularly relevant in the neuraxial use of morphine. We evaluated the frequency of these adverse events, as well as the need for additional analgesia in groups of various val158met alleles carriers, and found no statistically significant differences (Table 3).

The main indicator of the postoperative analgesia efficacy is the severity of pain at rest and during activation, as well as the intensity of side effects of the drugs used. The listed parameters did not differ in the groups of carriers of various SNP G1947A on day 1 after the surgery (Table 4).

The obtained results show that the use of spinal analgesia generally provides an adequate level of anesthesia on day 1 after laparoscopic surgery for colorectal cancer. Pain intensity not exceeding 3 points in NRS is considered acceptable and does not require additional treatment [12]. A combination of local anesthetic with low morphine doses (up to 300 μ g) is known to provide effective analgesia lasting from 16 to 20 hours without increasing the frequency of side effects, and the opioid-sparing effect remains up to 48 hours after surgery [4, 13]. In our study, 39% of patients required additional analgesia, but only 9% needed narcotic analgesics prescription. No cases of clinically significant respiratory depression ($SpO_2 \leq 90\%$ and/or respiratory rate ≤ 12 per min) were reported.

Таблица 3. Частота тошноты, рвоты, кожного зуда и потребность в дополнительном обезболивании в 1 сутки после операции.**Table 3. Frequency of nausea, vomiting, itching and the need for additional analgesia on Day 1 after surgery.**

Parameters	Value of parameters in groups		
	val/val (n=25)	val/met (n=45)	met/met (n=30)
Nausea, n (%)	10 (40)	17 (37.8)	13 (43.3)
Vomiting, n (%)	3 (12)	11 (24.4)	8 (26.7)
Itching, n (%)	14 (56)	29 (64.4)	16 (53.3)
Additional analgesia, n (%)	10 (40)	19 (42.2)	10 (33.3)

Примечание. Nausea — тошнота; vomiting — рвота; itching — кожный зуд; additional analgesia — дополнительное обезбоживание.

Таблица 4. Интенсивность боли, тошноты и кожного зуда в 1 сутки после операции.**Table 4. Intensity of pain, nausea and itching on day 1 after surgery.**

Group	SNP, %			ANOVA Kruskal–Wallis
	val/val (n=25)	val/met (n=45)	met/met (n=30)	
NRS ₁	2 (1–3)	2 (1–4)	1 (0–2)	P=0.173
NRS ₂	3 (2–5)	3 (3–5)	3 (1–5)	P=0.296
NRS ₃	3 (2–4)	4 (2–4)	4 (2–5)	P=0.517
NRS ₄	3.5 (2–4)	3 (2–4)	3.5 (2.5–4)	P=0.802

Примечание. NRS — ЦРП.

также интенсивность побочных эффектов используемых препаратов. Перечисленные параметры в 1 сутки после операции не отличались в группах носителей различных аллелей SNP val158met (табл. 4).

Анализ полученных результатов свидетельствует о том, что включение в комплекс анестезиологического пособия спинальной анальгезии в целом обеспечивает адекватный уровень обезбоживания в 1 сутки после лапароскопических операций по поводу колоректального рака. Интенсивность боли, не превышающая 3 баллов по ЦРП, считается приемлемой и не требует дополнительного лечения [12]. Известным является тот факт, что комбинация местного анестетика с низкими дозами морфина (до 300 мкг), обеспечивает эффективную анальгезию длительностью от 16 до 20 часов без увеличения частоты побочных эффектов, а опиоидсберегающий эффект сохраняется до 48 часов после операции [4, 13]. В нашем исследовании 39% пациентов потребовали дополнительного обезбоживания, но только у 9% возникла необходимость в назначении наркотических анальгетиков. Не зафиксировали ни одного случая клинически значимой респираторной депрессии ($SpO_2 \leq 90\%$ и/или ЧДД ≤ 12 в мин).

Результаты исследований оценивавших влияние SNP val158met на порог восприятия боли и эффективность системной анальгезии противоречивы. В руководстве по лечению острой боли Schug S. A. и соавт. (2015) [4] указывается, что у носителей аллели met наблюдается снижение болевого порога и повышение потребности в наркотических анальгетиках. Аналогичные данные приводят в своей работе Yao P. и соавт. (2015) [7], а также Спасова А. П. и

The results of the studies evaluating the effect of *COMT* val158met SNP on pain perception threshold and the efficacy of systemic analgesia are contradictory. Schug S. A. et al. (2015) in a manual of acute pain management [4] indicates that met allele carriers have decreased pain thresholds and increased need for narcotic analgesics. Similar data are provided by Yao P. et al. (2015) [7], as well as Spasova A. P. et al. (2016) [8]. At the same time, the results of Candiotti K.A. et al. (2014) [5] and our previous study [9] showed a decrease in pain intensity and the need for narcotic analgesics in this group of patients. The results of the most relevant meta-analysis suggest that heterozygous carriers of val/met require less opioids to achieve adequate postoperative analgesia [6].

We failed to identify the statistically significant influence of the *COMT* G194A SNP on the studied parameters. This suggests that at present this polymorphism can be disregarded when planning spinal analgesia in the investigated patient category. The study of other polymorphisms may help to predict the need for additional anesthesia and the frequency of nausea, vomiting and itching after subarachnoid use of local anesthetics and opioids. The efficacy of lidocaine use has been reported to depend on the polymorphism of the melanocortin receptor type 1 gene (*MC1R*), while that of some narcotic analgesics may depend on the opioid μ -receptor type 1 (*OPRM1*) and the cytochrome P450 (*CYP2D6*) system gene polymorphisms [1–4]. In the systemic use of opioids after nephrectomy, the need for antiemetic therapy was associated with another abnormality, namely *COMT* rs4818 SNP [5]. The impact of polymorphisms of cytochrome P450 (*CYP2D6*, *CYP3A4*), UDP glucuronyl transferase (*UGT2B7*), and ATP-binding cassette transporter (*ABCB1*, *ABCB3*), κ - and δ -opioid receptors (*OPRK*,

соавт. (2016) [8]. В то же время, результаты работы Candiotti K. A. и соавт. (2014) [5] и нашего предыдущего исследования [9], показали снижение интенсивности боли и потребности в наркотических анальгетиках в данной группе пациентов. Результаты наиболее актуального мета-анализа свидетельствуют, что гетерозиготные носители val/met требуют меньшего количества опиоидов для достижения адекватной послеоперационной аналгезии [6].

Нам не удалось выявить статистически значимого влияния SNP val158met гена *COMT* на исследуемые показатели. Это свидетельствует о том, что в настоящее время данный полиморфизм можно не учитывать при планировании спинальной аналгезии у обследованной категории пациентов. Возможно, изучение других полиморфизмов позволит прогнозировать потребность в дополнительном обезболивании, частоту тошноты, рвоты и кожного зуда на фоне субарахноидального применения местных анестетиков и опиоидов. Сообщается, что эффективность применения лидокаина может зависеть от полиморфизма гена меланокортинового рецептора 1 типа (*MC1R*), а некоторых наркотических анальгетиков — от полиморфизма генов опиоидного μ -рецептора 1 типа (*OPRM1*) и ферментов системы цитохрома P450 (*CYP2D6*) [1–4]. При системном применении опиоидов после нефрэктомии потребность в антиэметической терапии была связана с другим SNP гена *COMT* — rs4818 [5]. Проводилась оценка влияния полиморфизма генов цитохрома P450 (*CYP2D6*, *CYP3A4*), УДФ-глюкуронилтрансферазы (*UGT2B7*), АТФ-связывающего кассетного транспортера (*ABCB1*, *ABCB3*), κ - и δ -опиоидных рецепторов (*OPRK*, *OPRD*), калиевых каналов (*KCNJ6*, *KCNJ9*) на развитие кожного зуда после эпидурального применения морфина, но какой-либо связи найти не удалось [14].

В настоящее время в мире ведется интенсивный поиск молекулярно-генетических факторов прогноза и персонализированных подходов к лечению различных заболеваний, в том числе в медицине критических состояний и анестезиологии [1–3, 15–18]. Описано множество полиморфизмов, связанных с эффективностью периперационной аналгезии [1–9, 19]. Учитывая наличие большого количества генов-кандидатов и их комбинаций, потенциально способных оказывать влияние на качество обезбоживания, отрицательные результаты также имеют научно-практическое значение с точки зрения поиска наиболее клинически значимых из них. Полученные нами

OPRD), potassium channels (*KCNJ6*, *KCNJ9*) genes on itching after epidural use of morphine was investigated, but no link could be found [14].

Nowadays, an intensive search for molecular genetic prediction factors and personalized approaches to the treatment of various diseases is underway in critical medicine and anaesthesiology [1–3, 15–18]. Many polymorphisms related to the efficiency of perioperative analgesia have been described [1–9, 19]. Given the large number of candidate genes and their combinations potentially capable of affecting the quality of anesthesia, the negative results are also of scientific and practical importance for finding the most clinically informative genetic variants. The data obtained do not support the suggestion about the effect of *COMT*G1947A SNP on the efficiency of spinal analgesia on day 1 after laparoscopic surgery for colorectal cancer. To obtain the final conclusions further studies are necessary, because the calculations (G*Power, 3.1.9.4 software) show that the power of tests in our study is as low as 24.7%, whereas to achieve 80% power the sample volume should be as much as 264 [20].

Conclusion

This pilot study of the effect of *COMT* val158met SNP on the efficacy of spinal analgesia on 1 day 1 after laparoscopic surgery for colorectal cancer has not revealed such relationship. To reach the final conclusions, further studies with higher power are required.

данные не позволяют сделать вывод о влиянии SNP val158met гена *COMT* на эффективность спинальной аналгезии в 1 сутки после лапароскопических операций по поводу колоректального рака. Для получения окончательных выводов необходимо проведение дальнейших исследований, поскольку расчеты показывают (программа «G*Power 3.1.9.4»), что мощность тестов в нашем исследовании не превышает 24,7%, а для достижения мощности 80% необходима выборка объемом $n=264$ [20].

Заклучение

В настоящем пилотном исследовании зависимости эффективности спинальной аналгезии в 1 сутки после лапароскопических операций по поводу колоректального рака от SNP val158met гена *COMT* не выявили. Для получения окончательных выводов необходимо проведение дальнейших исследований с большей мощностью.

Литература

1. Махарин О.А., Женило В.М., Патюченко О.Ю. Современные представления о фармакогенетике боли. *Анестезиология и реаниматология*. 2016; 61 (3): 219–223. DOI: 10.18821/0201-7563-2016-3-219-223

References

1. Makharin O.A., Zhenilo V.M., Patyuchenko O.Yu. Modern ideas about the pharmacogenetics of pain. *Anesteziol. Reanimatol.* 2016; 61 (3): 219–223. [In Russ.] DOI: 10.18821/0201-7563-2016-3-219-223

2. Packiasabapathy S., Horn N., Sadhasivam S. Genetics of perioperative pain management. *Curr Opin Anaesthesiol.* 2018; 31 (6): 749–755. DOI: 10.1097/ACO.0000000000000660.
3. Palada V., Kaunisto M.A., Kalso E. Genetics and genomics in postoperative pain and analgesia. *Curr Opin Anaesthesiol.* 2018; 31 (5): 569–574. DOI: 10.1097/ACO.0000000000000633.
4. Schug S.A., Palmer G.M., Scott D.A., Halliwell R., Trinca J. Acute Pain Management: Scientific Evidence (4th edition). Melbourne: ANZCA & FPM; 2015: 714. ISBN: 978-0-9873236-7-5
5. Candiotti K.A., Yang Z., Buric D., Arheart K., Zhang Y., Rodriguez Y., Gitlin M.C., Carvalho E., Jaraba I., Wang L. Catechol-o-methyltransferase polymorphisms predict opioid consumption in postoperative pain. *Anesth Analg.* 2014; 119 (5): 1194–1200. DOI: 10.1213/ANE.0000000000000411
6. Hu B., Zhang X., Xu G., Zhang Q., Qian P., Liu S., Zhu J., Shen R. Association between COMT Polymorphism Val158Met and Opioid Consumption in Patients with Postoperative Pain: A Meta-Analysis. *Neurosignals.* 2018; 26 (1): 11–21. DOI: 10.1159/000487038
7. Yao P., Ding Y.Y., Wang Z.B., Ma J.M., Hong T., Pan S.N. Effect of gene polymorphism of COMT and OPRM1 on the preoperative pain sensitivity in patients with cancer. *Int J Clin Exp Med.* 2015; 8 (6): 10036–9. PMID: PMC4538055
8. Спасова А.П., Курбатова И.В., Барышева О.Ю., Тихова Г.П. Влияние полиморфизма гена катехол-О-метилтрансферазы на эффективность обезболивания у онкологических больных. *Российский журнал боли.* 2016; 51 (3–4): 32–42. eISSN: 2618-9860
9. Потопов А.Л., Бояркина А.В. Полиморфизм генов μ -опиоидного рецептора и катехол-О-метилтрансферазы влияет на предоперационное психологическое состояние пациентов и эффективность послеоперационной анальгезии наркотическими анальгетиками. *Анестезиология и реаниматология.* 2015; 60 (3): 48–51. PMID: 26415297
10. Затевахин И.И., Пасечник И.Н., Ачкасов С.И., Губайдуллин Р.Р., Лядов К.В., Проценко Д.Н., Шелыгин Ю.А., Цициашвили М.Ш. Клинические рекомендации по внедрению программы ускоренного выздоровления пациентов после плановых хирургических вмешательств на ободочной кишке. *Доктор.Ру.* 2016; 12–1 (129): 8–21.
11. Ivanova T.I., Krikunova L.I., Ryabchenko N.I., Mkrtchyan L.S., Khorokhorina V.A., Salnikova L.E. Association of the Apolipoprotein E 2 Allele with Concurrent Occurrence of Endometrial Hyperplasia and Endometrial Carcinoma. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2015; article ID 593658. DOI: 10.1155/2015/593658.
12. Kuusniemi K., Pöyhä R. Present-day challenges and future solutions in postoperative pain management: results from PainForum2014. *J Pain Res.* 2016; 9: 25–36. DOI: 10.2147/JPR.S92502.
13. Gehling M., Tryba M. Risks and side-effects of intrathecal morphine combined with spinal analgesia: a meta-analysis. *Anaesthesia.* 2009; 64 (6): 643–651. PMID: 19462494
14. Kung C.C., Chen S.S., Yang H.J., Lai C.J., Chen L.K. Pharmacogenetic study of pruritus induced by epidural morphine for post cesarean section analgesia. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2018; 57 (1): 89–94. DOI: 10.1016/j.tjog.2017.12.015.
15. Каприн А.Д., Галкин В.Н., Жаворонков Л.П., Иванов В.К., Иванов С.А., Романко Ю.С. Синтез фундаментальных и прикладных исследований — основа обеспечения высокого уровня научных результатов и внедрения их в медицинскую практику. *Радиация и риск.* 2017; 26 (2): 26–40. eISSN: 2412-950X
16. Каприн А.Д., Мардынский Ю.С., Смирнов В.П., Иванов С.А., Костин А.А., Полихов С.А., Решетов И.В., Фатьянова А.С., Денисенко М.В., Эпатова Т.В., Корнев С.В., Терещенко А.В., Филоненко Е.В., Гафаров М.М., Романко Ю.С. К истории развития лучевой терапии (часть I). *Biomedical Photonics.* 2019; 8 (1): 52–62. DOI: 10.24931/2413-9432-2019-8-1-52-62
17. Голубев А.М., Кузовлев А.Н., Антонова В.В., Захарченко В.Е., Петрова М.В., Гречко А.В. Молекулярные биомаркеры прогнозирования неврологического исхода после внезапной остановки кровообращения (обзор). *Общая реаниматология.* 2018; 14 (3): 68–81. eISSN: 2411-7110 DOI: 10.15360/1813-9779-2018-3-68-81
18. Писарев В.М., Чумаченко А.Г., Филев А.Д., Еришова Е.С., Костюк С.В., Вейко Н.Н., Григорьев Е.К., Елисина Е.В., Чертаков Р.А., Тутельян А.В. Комбинация молекулярных биомаркеров ДНК в прогнозе исхода критических состояний. *Общая реаниматология.* 2019; 15 (3): 31–47. eISSN: 2411-7110 DOI: 10.15360/1813-9779-2019-3-31-47
19. Соколов Д.А., Любосhevский П.А., Ганерт А.Н. Влияние полиморфизмов гена цитохрома P-450 на основной и побочные эффекты трамадола в послеоперационном периоде. *Региональная анестезия и лечение острой боли.* 2017; 11 (4): 240–246.
20. Faul F., Erdfelder E., Buchner A., Lang A.G. Statistical power analyses using G*Power 3.1: tests for correlation and regression analyses. *Behav Res Methods.* 2009; 41 (4): 1149–60. DOI: 10.3758/BRM.41.4.1149.
2. Packiasabapathy S., Horn N., Sadhasivam S. Genetics of perioperative pain management. *Curr Opin Anaesthesiol.* 2018; 31 (6): 749–755. DOI: 10.1097/ACO.0000000000000660.
3. Palada V., Kaunisto M.A., Kalso E. Genetics and genomics in postoperative pain and analgesia. *Curr Opin Anaesthesiol.* 2018; 31 (5): 569–574. DOI: 10.1097/ACO.0000000000000633.
4. Schug S.A., Palmer G.M., Scott D.A., Halliwell R., Trinca J. Acute Pain Management: Scientific Evidence (4th edition). Melbourne: ANZCA & FPM; 2015: 714. ISBN: 978-0-9873236-7-5
5. Candiotti K.A., Yang Z., Buric D., Arheart K., Zhang Y., Rodriguez Y., Gitlin M.C., Carvalho E., Jaraba I., Wang L. Catechol-o-methyltransferase polymorphisms predict opioid consumption in postoperative pain. *Anesth Analg.* 2014; 119 (5): 1194–200. DOI: 10.1213/ANE.0000000000000411
6. Hu B., Zhang X., Xu G., Zhang Q., Qian P., Liu S., Zhu J., Shen R. Association between COMT Polymorphism Val158Met and Opioid Consumption in Patients with Postoperative Pain: A Meta-Analysis. *Neurosignals.* 2018; 26 (1): 11–21. DOI: 10.1159/000487038
7. Yao P., Ding Y.Y., Wang Z.B., Ma J.M., Hong T., Pan S.N. Effect of gene polymorphism of COMT and OPRM1 on the preoperative pain sensitivity in patients with cancer. *Int J Clin Exp Med.* 2015; 8 (6): 10036–9. PMID: PMC4538055
8. Spasova A.P., Kurbatova I.V., Barysheva O.Y., Tikhova G.P. The effect of polymorphism of catechol-O-methyltransferase gene on efficiency of analgesia in cancer patients. *Rossiyskiy Zhurnal Boli.* 2016; 51 (3–4): 32–42. [In Russ.]
9. Potapov A.L., Boyarkina A.V. M1-opioid receptor and catechol-O-methyltransferase genes polymorphism effects on perioperative psychological condition of the patients and the effectiveness of postoperative analgesia with opioids. *Anesteziol. i Reanimatol.* 2015; 60 (3): 48–51. [In Russ.] PMID: 26415297
10. Zatevakhin I.I., Pasechnik I.N., Achkasov S.I., Gubaidullin R.R., Lyadov K.V., Protsenko D.N., Shelygin Yu. A., Tsitsiashevili M. Sh. Clinical recommendations on Fast Track introduction for patients having planned surgeries of segmented intestine. *Doktor.Ru.* 2016; 12–1 (129): 8–21. [In Russ.]
11. Ivanova T.I., Krikunova L.I., Ryabchenko N.I., Mkrtchyan L.S., Khorokhorina V.A., Salnikova L.E. Association of the Apolipoprotein E 2 Allele with Concurrent Occurrence of Endometrial Hyperplasia and Endometrial Carcinoma. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2015; article ID 593658. DOI: 10.1155/2015/593658.
12. Kuusniemi K., Pöyhä R. Present-day challenges and future solutions in postoperative pain management: results from PainForum2014. *J Pain Res.* 2016; 9: 25–36. DOI: 10.2147/JPR.S92502.
13. Gehling M., Tryba M. Risks and side-effects of intrathecal morphine combined with spinal analgesia: a meta-analysis. *Anaesthesia.* 2009; 64 (6): 643–651. PMID: 19462494
14. Kung C.C., Chen S.S., Yang H.J., Lai C.J., Chen L.K. Pharmacogenetic study of pruritus induced by epidural morphine for post cesarean section analgesia. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2018; 57 (1): 89–94. DOI: 10.1016/j.tjog.2017.12.015.
15. Kaprin A.D., Galkin V.N., Zhavoronkov L.P., Ivanov V.K., Ivanov S.A., Romanko Yu.S. Synthesis of basic and applied research is the basis of obtaining high-quality findings and translating them into clinical practice. *Radiatsiya i risk.* 2017; 26 (2): 26–40. [In Russ.] eISSN: 2412-950X
16. Kaprin A.D., Mardinskiy Yu.S., Smirnov V.P., Ivanov S.A., Kostin A.A., Polikhov S.A., Reshetov I.V., Fatianova A.S., Denisenko M.V., Epatova T.V., Korenev S.V., Tereshchenko A.V., Filonenko E.V., Gafarov M.M., Romanko Y.S. The history of radiation therapy (part I). *Biomedical Photonics.* 2019; 8 (1): 52–62. [In Russ.] DOI: 10.24931/2413-9432-2019-8-1-52-62
17. Golubev A.M., Kuzovlev A.N., Antonova V.V., Zakharchenko V.E., Petrova M.V., Grechko A.V. Molecular Biomarkers for Prediction of Neurological Outcome after Sudden Circulatory Arrest (Review). *Obshchaya Reanimatologiya = General Reanimatology.* 2018; 14 (3): 68–81. [In Russ.] eISSN: 2411-7110 DOI: 10.15360/1813-9779-2018-3-68-81
18. Pisarev V.M., Chumachenko A.G., Filev A.D., Ershova E.S., Kostyuk S.V., Veiko N.N., Grigoriev E.K., Elysina E.V., Cherpakov R.A., Tutelyan A.V. Combination of DNA Molecular Biomarkers in the Prediction of Critical Illness. Outcome. *Obshchaya Reanimatologiya = General Reanimatology.* 2019; 15 (3): 31–47. [In Russ.] eISSN: 2411-7110 DOI: 10.15360/1813-9779-2019-3-31-47
19. Sokolov D.A., Lyuboshevskiy Pavel A., Ganert A.N. Influence of cytochrome p-450 genetic polymorphisms on the main and side effects of tramadol in the postoperative period. *Regionarnaya anesteziya i lechenie ostroy boli.* 2017; 11 (4): 240–246. [In Russ.]
20. Faul F., Erdfelder E., Buchner A., Lang A.G. Statistical power analyses using G*Power 3.1: tests for correlation and regression analyses. *Behav Res Methods.* 2009; 41 (4): 1149–1160. DOI: 10.3758/BRM.41.4.1149.

Received 30.04.19

Поступила 30.04.19

Дефекты мембран эритроцитов у пациентов с нарушениями функции головного мозга (пилотное исследование)

А. В. Гречко¹, И. В. Молчанов², В. А. Сергунова², Е. К. Козлова^{2,3}, А. М. Черныш^{2,3}

¹ Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии, Россия, 141534, Московская область, Солнечногорский район, д. Лыткино, д. 777

² НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского ФНКЦ РР Россия, 107031, г. Москва, ул. Петровка, д. 25, стр. 2

³ Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава России, Россия, 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

Defects of Red Blood Cell Membranes in Patients with Brain Dysfunction (Pilot Study)

Andrey V. Grechko¹, Igor V. Molchanov², Victoria A. Sergunova², Elena K. Kozlova^{2,3}, Alexander M. Chernysh^{2,3}

¹ Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitology, 777 Lytkino 141534, Solnechnogorsk district, Moscow region, Russia

² V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology, Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitology, 25 Petrovka Str., Build. 2, 107031 Moscow, Russia

³ I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia, 8 Trubetskaya Str., Bldg. 2, 119991 Moscow, Russia

Цель работы. Выявление перспективных диагностических и прогностических биомаркеров развития патологических процессов на основе особенностей морфологии и наноструктуры мембран эритроцитов у пациентов с нарушениями функции головного мозга, находящихся в отделении анестезиологии и реанимации.

Материалы и методы. В исследование включили 24 пациента отделения анестезиологии и реанимации ФНКЦ РР. Кровь забирали у данных пациентов для стандартных анализов, и все дальнейшие исследования проводили *in vitro*. Изображения эритроцитов получали с помощью атомного силового микроскопа «NTEGRA Prima» (NT-MDT, Россия) в полуконтактном режиме.

Результаты. У пациентов отделения анестезиологии и реанимации с черепно-мозговой травмой, ишемическим и геморрагическим инсультом, отеком головного мозга, постгипоксической энцефалопатией имели место различные формы клеток крови, на поверхности мембраны эритроцитов возникали локальные дефекты различной топологии: дефекты паллора, тора, наноструктуры.

Заключение. В данном пилотном исследовании мы показали, что ряд дефектов являются стартовым механизмом развития тотальных повреждений мембран. Локальные топографические дефекты наноструктур, а также нарушения морфологии эритроцитов необратимы. Количество и качество этих нарушений в перспективе могут быть использованы как диагностический и прогностический биомаркер патологических процессов.

Ключевые слова: эритроциты; наноструктура мембран; атомная силовая микроскопия

The aim of the paper: to identify promising diagnostic and prognostic biomarkers of pathological processes development based on the red blood cell membrane morphology and nanostructure in patients with brain disorders in the Intensive Care Unit.

Materials and methods. The study included 24 patients from the anesthesiology and resuscitation ward of the Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitology. Blood was acquired from the patients for standard tests, and all further tests were performed *in vitro*. The images of red blood cells were obtained using the atomic force microscope «NTEGRA Prima» (NT-MDT, Russia) in semi-contact mode.

Results. Patients from the anesthesiology and intensive care ward with traumatic brain injury, ischemic and hemorrhagic stroke, cerebral edema, and post-hypoxic encephalopathy had different blood cell shapes and localized defects of different topology on the surface of erythrocyte membranes including defects of pallor, torus, and nanostructure.

Conclusion. In this pilot study we have shown that several defects represent the trigger mechanisms for the development of a total membrane damage. Local topographic defects of nanostructures and abnormalities

Адресс для корреспонденции:

Александр Михайлович Черныш
E-mail: orbf@mail.ru

Correspondence to:

Alexander M. Chernysh
E-mail: orbf@mail.ru

of erythrocyte morphology are irreversible. The number and quality of these abnormalities may eventually be used as a diagnostic and prognostic biomarker of pathological processes.

Keywords: *red blood cells; membrane nanostructure; atomic force microscopy*

DOI:10.15360/1813-9779-2019-6-11-20

Введение

Одной из приоритетных проблем реаниматологии является исследование механизмов развития критических и терминальных состояний на органном, клеточном и молекулярном уровнях [1, 2]. Изучению вопросов, связанных с изменением эритроцитов при терминальных состояниях, посвящен ряд исследований, проведенных на клеточном уровне [3], однако, вопрос об изменениях наноструктуры мембран эритроцитов при различных патологических состояниях остается открытым. При ряде состояний таких как ишемия, гипертония, атеросклероз в организме происходит кислородное голодание. Происходит изменение морфологии эритроцитов — пойкилоцитоз [4]. Состояние мембран эритроцитов играет важную роль в сохранении их целостности [5] и в осуществлении их газотранспортной функции [6].

В ряде работ показано, что наноструктура мембран влияет на жесткость эритроцитов, а, следовательно, и на реологию крови в целом и на качество периферического кровотока [7]. Основным показателем функционирования эритроцита является стабильность наноструктуры мембраны на всех уровнях ее организации [8–10].

Таким образом, изучение наноструктуры мембран эритроцитов у пациентов отделения реанимации является одной из актуальных задач реаниматологии [11–13].

Важным направлением развития современной медицины в целом и реаниматологии в частности является применение новейших физических и биофизических методов исследования наноструктур мембран эритроцитов [14]. Наиболее универсальным и информативным методом изучения наноструктуры мембраны является метод сканирующей зондовой микроскопии, в частности, атомной силовой микроскопии (АСМ) [15–18]. Этот метод позволяет регистрировать наноструктуру мембраны в широком диапазоне ее изменений — от микрона до долей нанометров. АСМ дает возможность обнаружить морфологические изменения при заболеваниях [19], при острой кровопотере [20] и при различных физико-химических воздействиях [15]. Это определяется тем, что при критических состояниях, при кровопотерях, при сочетанных травмах собственные параметры мембран эритроцитов меняются в широких пределах [21, 22].

Introduction

One of the key issues of intensive care is the study of mechanisms of critical illness and terminal states development at the organ, cellular and molecular levels [1, 2]. A number of studies done at the cellular level dealt with red blood cell alterations in terminal states [3], however, the nanostructure changes of the RBC membranes in various conditions remained to be investigated. In various diseases such as ischemia, hypertension, and atherosclerosis, an oxygen starvation occurs in the body. Erythrocyte morphology also changes — poikilocytosis develops [4]. The state of erythrocyte membranes plays an important role in the maintenance of their integrity [5] and in gas transport function [6].

Several studies have shown that the nanostructure of membranes affects RBC stiffness and, consequently, blood flow in general and the quality of peripheral blood flow in particular [7]. The main indicator of erythrocyte functioning is the stability of the membrane nanostructure at all levels of its structure [8–10].

Thus, the study of RBC membrane nanostructure in the intensive care unit (ICU) patients is one of the key priorities of intensive care [11–13].

One of the challenges of contemporary medicine, specifically, in ICU setting, includes to study nanostructures of erythrocyte membranes with the aid of the latest physical and biophysical techniques [14]. The most universal and informative technique for studying membrane nanostructures is the scanning probe microscopy, namely, atomic force microscopy (AFM) [15–18]. This method allows to detect the wide range of the membrane nanostructure changes, from microns to fractions of nanometers. AFM helps to detect morphological alterations in diseases [19], acute blood loss [20], and following the effects of various physical and chemical factors [15]. This is due to wide variations of erythrocyte membrane parameters in critical conditions, blood loss, and combined traumas [21, 22].

The aim of this work was to reveal promising diagnostic and prognostic candidate biomarkers of pathological process development based on erythrocyte membrane shape and nanostructure in patients with brain dysfunction in the anesthesiology and resuscitation ward.

Materials and Methods

The research was conducted by the laboratory of cell membrane biophysics in critical conditions of the

Цель работы — выявление перспективных диагностических и прогностических биомаркеров развития патологического процесса на основе особенностей морфологии и наноструктуры мембран эритроцитов у пациентов с нарушениями функции головного мозга, находящихся в отделении анестезиологии и реанимации.

Материал и методы

Работа выполнена лабораторией биофизики мембран клеток при критических состояниях НИИОР им. В. А. Неговского ФНКИЦ РР совместно с лабораторией метаболической реабилитации отделения анестезиологии и реанимации ФНКИЦ РР.

В исследование включили 24 пациента отделения анестезиологии и реанимации ФНКИЦ РР с черепно-мозговой травмой (ЧМТ), ишемическим и геморрагическим инсультом, отеком головного мозга (ОГМ), постгипоксической энцефалопатией (ПГЭ), тромбозом вен.

Кровь забирали у данных пациентов для стандартных анализов, и все дальнейшие исследования проводили *in vitro*. Все исследования проводили с учетом требований Хельсинской декларации Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г, а также с нормами этического комитета ФНКИЦ РР.

После забора 10 мкл цельной крови наносили на предметное стекло и приготавливали монослой эритроцитов с помощью прибора «V-sampler, Vision Microscopy» (Австрия).

Изображения эритроцитов получали с помощью атомного силового микроскопа «NTEGRA Prima» (NT-MDT, Россия) в полуконтактном режиме. В качестве зондов использовали кантилеверы NSG01-A. Число точек сканирования 512 и 1024, поля сканирования 100×100 мкм, 10×10 мкм.

Исследование состояния клеток крови и их мембран включало:

- анализ морфологии эритроцитов;
- анализ размеров клеток, анизоцитоза, пойкилоцитоза;
- оценку состояния наноструктуры мембран эритроцитов;
- оценку состояния и содержания в крови тромбоцитов.

В качестве группы сравнения использовали эритроциты и мембраны здоровых доноров и нормы, которые известны по данным литературы, и нами неоднократно были описаны [7, 22].

Результаты и обсуждение

У здорового человека основную массу составляют эритроциты двояковогнутой формы — дискоциты (80–90%). В норме диаметр эритроцита составлял 7500±500 нм. Максимальная высота тора дискоцита в монослое — 1500 нм, высота впадины — 420 нм [7, 10, 22].

У пациентов, включенных в исследование, наблюдали различные формы эритроцитов (таблица).

V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology of the Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitation (FRCCICMR) in cooperation with the laboratory of metabolic rehabilitation of the Anesthesiology and Resuscitation Department of the FRCCICMR.

The study included 24 patients of the Anesthesiology and Resuscitation Department of the FRCCICMR with traumatic brain injury (TBI), ischemic and hemorrhagic stroke, brain edema, posthypoxic encephalopathy (PHE), venous thrombosis.

Blood was taken from the patients for standard tests, and all further tests were performed *in vitro*. All studies were conducted in accordance with the requirements of the World Medical Association Helsinki Declaration on the ethical principles of scientific medical research involving human subjects, as amended in 2000, as well as with the standards of the FRCCICMR Ethics Committee.

After 10 µl of whole blood had been collected, a monolayer of red blood cells was prepared using the V-Sampler, Vision Microscopy (Austria).

The images of red blood cells were obtained using the atomic force microscope «NTEGRA Prima» (NT-MDT, Russia) in semi-contact mode. Cantilevers NSG01-A were used as probes. The number of scanning points was 512 and 1024, scanning fields were 100×100 µm and 10×10 µm.

The study of the state of blood cells and their membranes included:

- erythrocyte morphology analysis;
- analysis of cell size, anisocytosis, poikilocytosis presence;
- assessment of nanostructure state of erythrocyte membranes;
- assessment of the condition and blood count of platelets.

As a control group, we used erythrocytes and healthy donor membranes and reference ranges taken from the literature and repeatedly described in our papers as well [7, 10, 22].

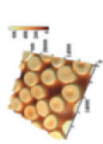
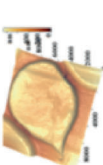
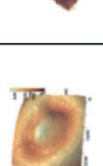
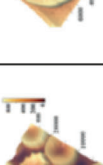
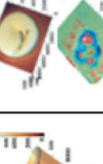
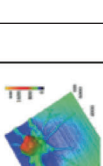
Results and Discussion

In a healthy person, the bulk of the RBC population is made up of double concave cells called discocytes (80–90%). Normally, the erythrocyte diameter is 7500±500 nm. The maximum height of the discocyte torus in the monolayer is 1500 nm, the height of the central indentation is 420 nm [7, 22].

Different shapes of red blood cells were observed in the patients included in the study (Table).

Target cells, or codocytes, are cells with a thickened center where hemoglobin accumulates. These cells are large and heavily compacted, which prevents their free passage through thin vessels. Codocytes are typical for alpha- and beta-thalassemia, hemoglobinopathy C and S, lead intoxication and liver disease, particularly prolonged mechanical jaundice. Codocytes are particularly common in obstructive jaundice. Target cells have increased sodium content and decreased potassium content [23]. These cells (Fig. 1 *a, b, c*) were observed

Формы эритроцитов в исследованных образцах крови.
Shapes of RBCs in the blood samples studied.

Red Blood Cells							Platelets	
Shapes							Defective	
Discocytes	Tear-like (dacryocytes)	Ovalocytes	Codocytes	Echinocytes (burr cells)	Stomatocytes	Abnormal	Torus	Central indentation
								
States and diseases							States and diseases	
Normal, healthy person	TBI	TBI, ischemic stroke	TBI, ischemic and hemorrhagic stroke, cerebral edema, posthypoxic encephalopathy, lower extremity venous thrombosis					

Примечание. Red Blood Cells — эритроциты; shapes — формы; defective — дефекты; platelets — тромбоциты; discocytes — дискоциты; codocytes — кодоциты; echinocytes (burr cells) — эхиноциты; tear-like (dacryocytes) — слезовидные (дакриоциты); stomatocytes — стоматоциты; abnormal — аномальные; torus — на торе; Central indentation — во впадине; states and diseases — состояния и заболевания; normal, healthy person — норма, здоровый человек; TBI — ЧМТ; ischemic and hemorrhagic stroke — ишемический и геморрагический инсульт; cerebral edema — ОГМ; posthypoxic encephalopathy — ППЭ; lower extremity venous thrombosis — тромбоз вен нижних конечностей.

in 14 patients out of 24, on average, $20 \pm 8\%$ per smear. Codocytes were found in patients with traumatic brain injury, posthypoxic encephalopathy, ischemic and hemorrhagic stroke, cerebral edema, lower extremity venous thrombosis (Table).

Abnormal erythrocytes are red blood cells that do not fall within the standard classification (Fig. 1 *d, e, f*), they were observed in 17 out of 24 patients. On the average, $28 \pm 6\%$ of abnormal cells were seen per smear in each patient.

Stomatocytes have a slit-like central lumen (pallor). They are produced due to the increased permeability of the membrane for sodium and potassium. Stomatocytes with slit defects (Fig. 2 *a, b, c*) were observed in 17 patients out of 24. The smears of each patient contain on the average $16 \pm 4\%$ stomatocytes with slit defects. These cells are formed as a result of low pH, non-permeating anions, cationic detergents, vitamin A. In a smaller number (approximately 3% of the total cell population), stomatocytes can be found in obstructive liver disease, alcoholic cirrhosis, cardiovascular disease, and malignant tumors [23]. Stomatocytes were observed in patients with lower extremity venous thrombosis, cerebral edema, traumatic brain injury, posthypoxic encephalopathy, cerebral infarct (Table).

Dacryocytes, or teardrop red blood cells (Fig. 2 *d*), have one large spicula. They were observed in 2 out of 24 patients with traumatic brain injury, with an average of $21 \pm 4\%$ dacryocytes per smear in each patient with TBI. Such cells are most often detected in myelofibrosis [24] and in various forms of anemia. Hemoglobin crystallization inside a cell like this is particularly dangerous [25].

Each echinocyte has 30–50 spiculas of similar size evenly distributed on the cell surface. Such erythrocytes are produced due to the increase of pH, depletion of ATP stores [26], and also due to the increase of intracellular calcium. They can be found in uremia, transfusion of RBC suspension stored for more than 3 weeks [27], peptic ulcer complicated by bleeding, hypophosphatemia, hypomagnesemia, hereditary deficit of pyruvate kinase or phosphoglycerate kinase [23].

Echinocytes were observed in 18 out of 24 patients, on the average $26 \pm 4\%$ per smear. Transformation of discocyte to echinocyte is reversible in the early stages. If the cell stays in a state of echinocyte for a long time, the loss of the membrane lipid component occurs and the change of shape becomes irreversible. This form of cells was noted in patients with posthypoxic encephalopathy, traumatic brain injury, ischemic and hemorrhagic stroke (Table 1).

Ovalocytes (Fig. 3) have typical oval or elongated shape. Membrane or hemoglobin abnormalities result into a change of cell shape. Ovalocytes were observed in 2 out of 24 patients, with an aver-

Мишеневидные эритроциты или кодоциты — клетки с утолщением в центре, в котором скапливается гемоглобин. Такие клетки имеют большие размеры и сильно уплотнены, что препятствует их свободному прохождению через тонкие сосуды. Кодоциты характерны для а- и р-талассемии, гемоглобинопатии С и S, свинцовой интоксикации и болезней печени, в частности, длительной механической желтухи. Кодоциты особенно часто встречаются при обструктивной желтухе. У мишеневидных клеток увеличена концентрация натрия и снижена концентрация калия [23]. Эти клетки (рис. 1 *a, b, c*) наблюдались у 14 пациентов из 24, в среднем, $20 \pm 8\%$ на мазке. Кодоциты наблюдали у пациентов с черепно-мозговой травмой, постгипоксической энцефалопатией, ишемическим и геморрагическим инсультом, отеком головного мозга, тромбозом вен нижних конечностей (см. табл.).

Аномальные эритроциты — это эритроциты, которые по своим характеристикам не входят в стандартную классификацию (рис. 1 *d, e, f*), наблюдали у 17 пациентов из 24. У каждого пациента на мазке встречали в среднем $28 \pm 6\%$ аномальных клеток.

Стоматоциты имеют щелевидную форму центрального просвета (пэллора). Причиной их появления является повышенная проницаемость мембраны для натрия и калия. Стоматоциты с дефектами щели (рис. 2 *a, b, c*) наблюдали у 17 пациентов из 24. В среднем, $16 \pm 4\%$ стоматоцитов с дефектами щели присутствует в мазках каждого пациента. Эти клетки образуются под действием: низкого pH, не проникающих анионов, катионных детергентов, витамина А. В меньшем числе (приблизительно 3% от общей популяции клеток) стоматоциты встречаются при обструктивных болезнях печени, алкогольном циррозе, кардиоваскулярной патологии, злокачественных опухолях [23]. Стоматоциты наблюдали у пациентов с тромбозом вен нижних конечностей, отеком головного мозга, черепно-мозговой травмой, постгипоксической энцефалопатией, инфарктом головного мозга (см. табл.).

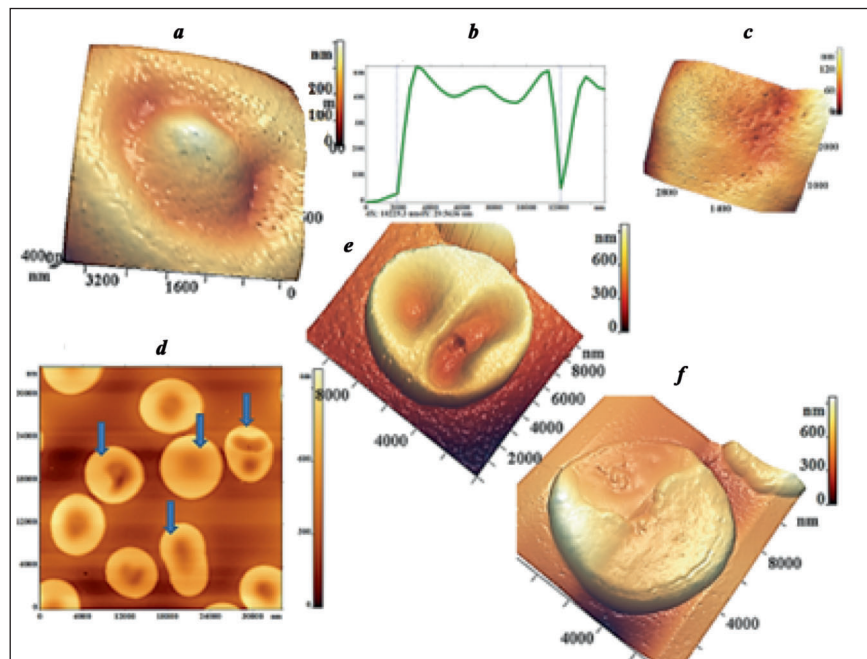


Рис. 1. АСМ изображение эритроцитов: *a, b* — фрагмент мембраны кодоцита и его профиль; *c* — наноструктура фрагмента мембраны кодоцита; *d* — аномальные эритроциты 30×30 мкм (синие стрелки); *e, f* — аномальные эритроциты 10×10 мкм.

Fig. 1. AFM image of erythrocytes: *a, b* — fragment of codocyte membrane and profile of a codocyte; *c* — nanostructure of a codocyte membrane fragment; *d* — abnormal erythrocytes 30×30 μm (blue arrows); *e, f* — abnormal erythrocytes 10×10 μm .

age of $8 \pm 3\%$ per smear. Elliptocytes (ovalocytes) normally make up less than 1% of all cells. In case of anemia (thalassemia, iron deficiency and especially megaloblastic) their level reaches as much as 10%. The population of elliptocytes is not uniform in size [23]. Such cells were observed in patients with ischemic stroke and TBI (Table).

Metabolic disturbances and damage to cell membranes cause an increase in the population of echinocytes, target cells and degenerative forms of erythrocytes, which may be accompanied by a high probability of intravascular hemolysis and thus contribute to the development of blood hypoxia [28]. This is supported by the fact that irreversibly altered red blood cells are prone to premature aging and hemolysis. The abnormally shaped RBC have less plasticity and while passing through the smallest vessels can further worsen the blood flow and dramatically change the capillary exchange [29, 30].

Figure 4 shows an image of red blood cells in the AFM field of 10×10 μm with pallor defects. Normal RBC indentation height is 400–450 nm.

An average of $70 \pm 15\%$ of RBC with a pallor defect per smear were found in 17 of 24 patients (Fig. 4 *a, b*). Defects in the pallor itself (Fig. 4 *c, d, e*) were observed in smears of 15 patients out of 24. In case of traumatic brain injury, ischemic and hemorrhagic stroke, cerebral edema, posthypoxic encephalopathy, lower extremity venous thrombosis, their number may increase up to $50 \pm 16\%$ per smear.

Дакриоциты или слезовидные эритроциты (рис. 2 *d*) имеют одну большую спикулу. Их наблюдали у 2 из 24 пациентов с черепно-мозговой травмой, в среднем — $21 \pm 4\%$ дакриоцитов на мазке у каждого пациента с ЧМТ. Такие клетки чаще всего выявляются при миелофиброзе [24], при различных формах анемии. Особая опасность заключается в возможной кристаллизации гемоглобина внутри клетки [25].

Эхиноциты имеют на поверхности выросты, сходной величины, равномерно распределенные на поверхности клетки в количестве 30–50 спикул. Такие эритроциты образуются при увеличении рН, истощении запасов АТФ [26], а также при повышении уровня внутриклеточного кальция. Встречаются при уремии, переливании эритроцитарной взвеси после 3 недели хранения [27], пептической язве, осложненной кровотечением, гипофосфатемии, гипомagneмией, при наследственном дефиците пируваткиназы, фосфолипидаткиназы [23].

Эхиноциты наблюдали у 18 пациентов из 24, в количестве $26 \pm 4\%$ на мазке. Трансформация дискоцит-эхиноцит в начальной стадии обратима. Если клетка долго пребывает в состоянии эхиноцита, то возникает потеря липидного компонента мембраны и изменение формы становится необратимым. Такую форму клеток наблюдали у пациентов с постгипоксической энцефалопатией, черепно-мозговой травмой, ишемическим и геморрагическим инсультом (см. табл.).

Овалоциты (рис. 3) — клетки характерной овальной или удлинненной формы. Аномалии мембраны или гемоглобина приводят к изменению формы клетки. Овалоциты наблюдали у 2 пациентов из 24, в среднем — $8\% \pm 3$ на мазке. Эллиптоциты (овалоциты) в норме составляют менее 1% всех клеток. При различных анемиях (талассемия, железодефицитная и особенно мегалобластная анемия) их содержание достигает до 10%. При этом популяция эллиптоцитов неоднородна по размерам [23]. Такие клетки наблюдали у пациентов с ишемическим инсультом и черепно-мозговой травмой (см. табл.).

Метаболические нарушения и повреждения клеточных мембран вызывают увеличение

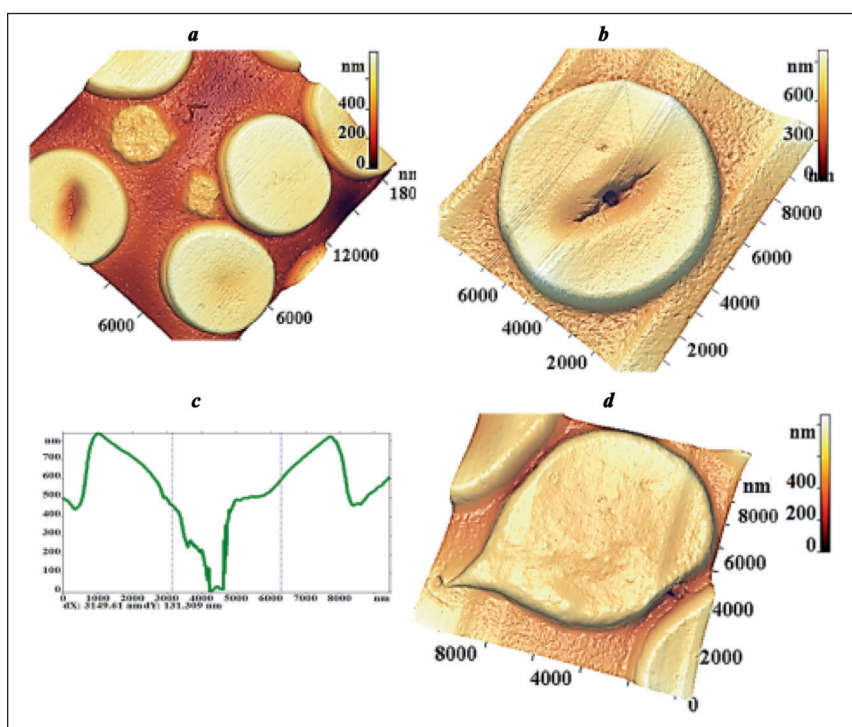


Рис. 2. АСМ изображение эритроцитов: *a* — аномальные эритроциты 30×30 мкм; *b*, *c* — стоматоцит с дефектами щели и его профиль; *d* — дакриоцит.

Fig. 2. AFM images of erythrocytes: *a* — abnormal erythrocytes 30×30 μm; *b*, *c* — a stomatocyte with slit defects and a profile of a stomatocyte with slit defects; *d* — a dacryocyte.

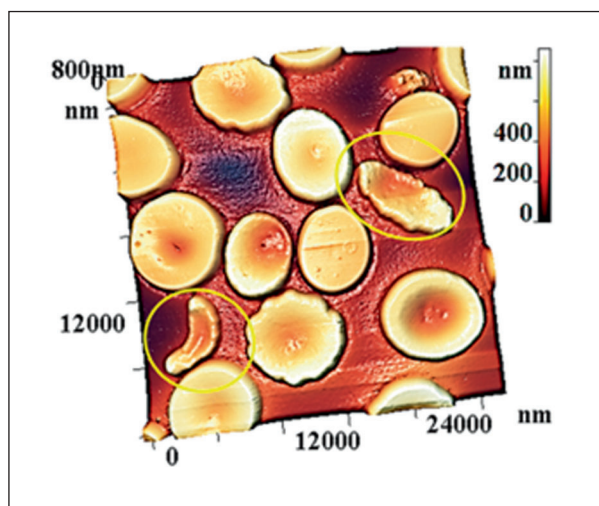


Рис. 3. АСМ изображение эритроцитов в поле 25×25 мкм. Fig. 3. AFM image of erythrocytes in the field of 25×25 μm.

Note. Yellow circles indicate ovalocytes.

Примечание. Желтыми кругами выделены овалоциты.

In 5 out of 24 patients, microdefects were observed on the torus (Fig. 5 *a*, *b*), with an average of $10 \pm 3\%$ per smear. Six out of 24 patients had grain domains on the torus (Fig. 5 *c*, *d*, *e*), with an average of $15 \pm 6\%$ per smear. This represents the starting mechanism for the irreversible membrane damage. Microdefects on the torus appeared in patients with the above mentioned abnormalities.

In all studied patients, $16 \pm 7\%$ of active platelets were observed per smear (Fig. 6).

популяции эритроцитов, мишеневидных и дегенеративных форм эритроцитов, что может сопровождаться высокой вероятностью внутрисосудистого гемолиза и, тем самым, способствовать развитию гемической гипоксии [28]. В пользу этого свидетельствуют данные о том, что необратимо измененные эритроциты склонны к преждевременному старению и гемолизу. Измененные формы эритроцитов обладают меньшей пластичностью в результате чего прохождение таких клеток в мельчайших сосудах усугубляет нарушение кровотока и резко изменяет капиллярный обмен [29].

На рис. 4 представили изображение красных клеток крови в поле АСМ 10×10 мкм с дефектами паллора. У нормального эритроцита впадина — 400–450 нм.

На мазках 17 из 24 пациентов встречали в среднем $70 \pm 15\%$ эритроцитов с дефектом паллора (рис. 4 *a, b*). Дефекты в самом паллоре (рис. 4 *c, d, e*) наблюдали на мазках у 15 пациентов из 24. При черепно-мозговой травме, ишемическом инсульте, отеке головного мозга, постгипоксической энцефалопатии, тромбозе вен нижних конечностей их количество может увеличиваться до $50 \pm 16\%$ на мазке.

У 5 пациентов из 24 наблюдали микродефекты на торе (рис. 5 *a, b*), в среднем — $10 \pm 3\%$ на мазке. У 6 пациентов из 24 на торе появлялись зерновые домены (рис. 5 *c, d, e*), в среднем — $15 \pm 6\%$ на мазке. Это стартовый механизм зарождения необратимых повреждений мембран. Микродефекты на торе появлялись у пациентов с перечисленными выше патологиями.

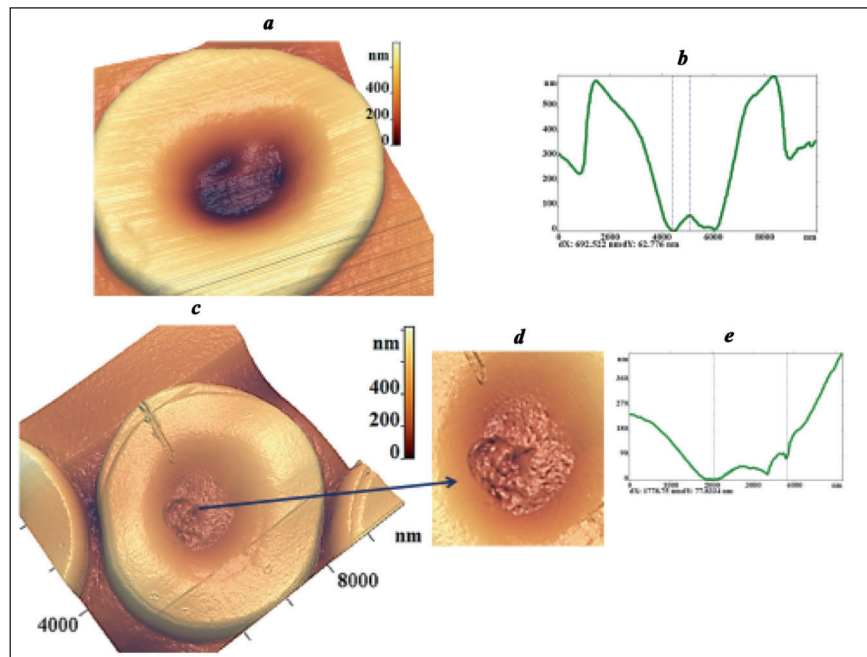


Рис. 4. АСМ изображение эритроцитов: *a, b* — дискоцит с дефектом паллора и его профиль; *c* — дискоцит с дефектом в самом паллоре; *d, e* — фрагмент мембраны дефекта в самом паллоре (синяя стрелка указывает дефект и его профиль).
Fig. 4. AFM image of erythrocytes: *a, b* — a discocyte with a pallor defect and its profile; *c* — a discocyte with a defect in the pallor itself; *d, e* — a membrane fragment of the defect in the pallor itself (the blue arrow indicates the defect and its profile).

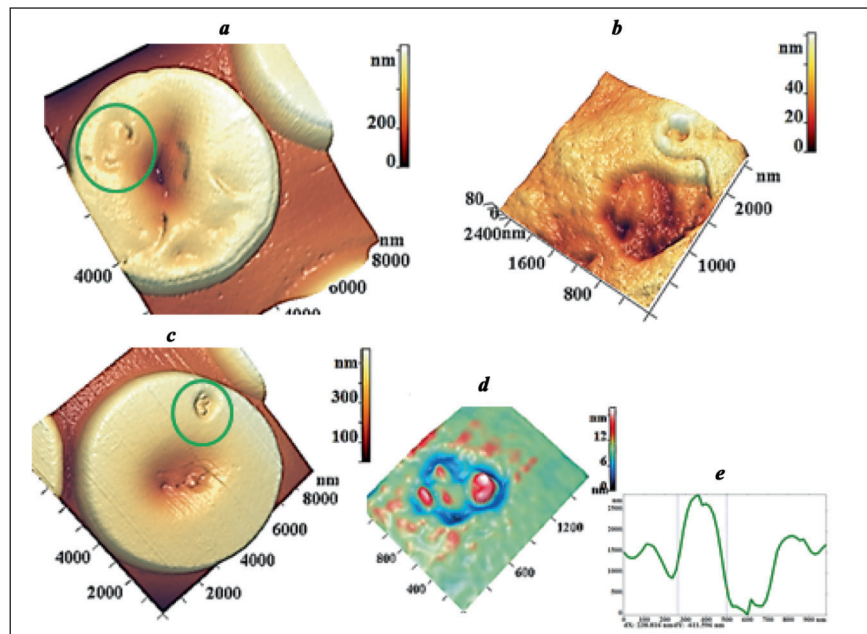


Рис. 5. АСМ изображение эритроцитов: *a* — эритроцит с микродефектом на торе; *b* — фрагмент мембраны с микродефектом на торе; *c* — дискоцит с зерновыми доменами; *d, e* — наноструктура мембраны эритроцита с зерновыми доменами и его профиль.

Fig. 5. AFM image of erythrocytes: *a* — erythrocyte with a microdefect on torus; *b* — membrane fragment with a microdefect on torus; *c* — discocyte with grain domains; *d, e* — erythrocyte membrane nanostructure with grain domains and its profile.

Note. Green circles indicate the defects.

Примечание. Зелеными кругами выделены дефекты.

Platelets are among the indicators of acute inflammation in sepsis, tumors, bleeding. The increase

У всех пациентов, включенных в исследование, наблюдали $16 \pm 7\%$ активных тромбоцитов на мазке (рис. 6).

Тромбоциты входят в число показателей острой фазы воспаления при сепсисе, опухолях, кровотечениях. Увеличение количества тромбоцитов является сигналом развития воспалительных патологий. При активации тромбоциты приобретают сферическую форму и образуют специальные выросты (псевдоподии), как правило, это фибриногены, гликопротеины и другие белковые фракции плазмы. Главные факторы активации тромбоцита: тромбин плазмы, тромбоксан (продукт тромбоцита), АДФ. С помощью подобных выростов кровяные пластинки могут соединяться друг с другом (агрегировать) и образовывать тромб [29, 30].

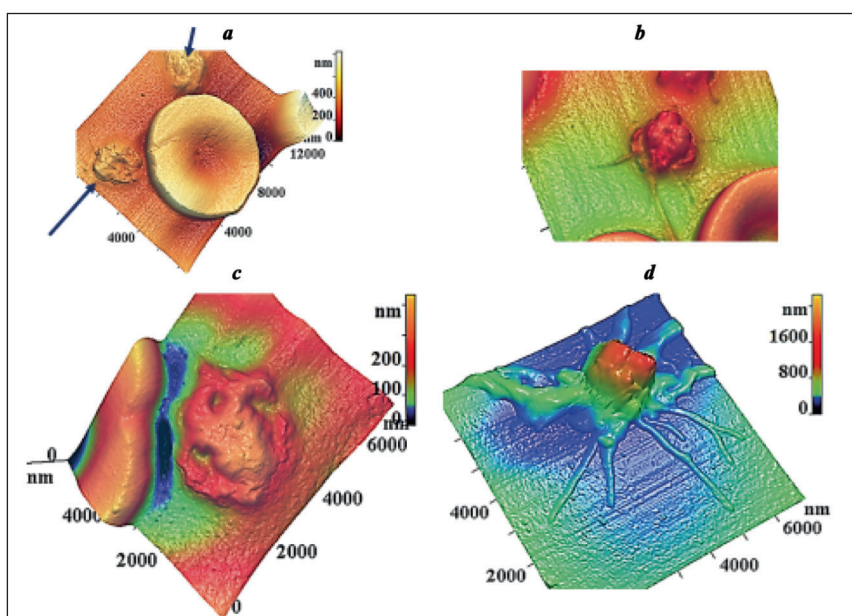


Рис. 6. АСМ изображение: *a* — дискцит и активные тромбоциты (синие стрелки); *b, c, d* — активные тромбоциты.

Fig. 6. AFM image: *a* — a discocyte, blue arrows indicate active platelets; *b, c, d* — active platelets.

Закключение

В данном пилотном исследовании мы показали, что при указанных патологиях имеют место изменения морфологии, состава эритроцитов, возникают специфические локальные дефекты различной топологии: дефекты паллора, тора, наноструктуры. Ряд дефектов является стартовым механизмом развития тотальных повреждений мембран эритроцитов: например, образование зерновых доменов на поверхности мембраны, образование спикул на торе, возникновение сфероэритроцитоза, увеличение модуля Юнга мембраны. Количество и качество этих нарушений в перспективе могут быть использованы как диагностический и прогностический биомаркер патологических процессов.

Для получения полной классификации нарушений мембранных структур эритроцитов, достоверно ассоциированных с исследуемыми патологическими состояниями, необходимо продолжить исследование и увеличить выборку результатов.

Благодарность.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации и «Russian Academic Excellence Project 5-100».

in the number of platelets is an indicator of inflammatory disorders. When activated, platelets appear spherical and form extensions called pseudopodia, which are typically made of fibrinogen, glycoproteins and other protein fractions of plasma. The main factors of platelet activation are plasma thrombin, thromboxane (platelet product), ADP. With the help of these extensions, the platelets may connect with each other (aggregate) and form a clot [30].

Conclusion

In this pilot study, we have shown that various factors lead to changes in morphology and composition of RBCs, as well as specific local defects in various topologies, i. e. pallor, torus, and nanostructure. Several defects represent the starting points for the development of total erythrocyte membrane damage, e. g. grain domains on the membrane surface or spiculas on the torus, the occurrence of spher- or echinocytes, and the increase in the Young's module of the membrane. The number and quality of these disorders can be used as a diagnostic and prognostic biomarker of pathological processes in the perspective.

It is necessary to proceed with the research and increase the sample size to get a complete classification of erythrocyte membrane structural alterations, which reliably associate with the studied conditions.

Acknowledgments. This work has been supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation and by the «Russian Academic Excellence Project 5-100».

Литература

- Costa K.D. Imaging and probing cell mechanical properties with the atomic force microscope. *Meth. Mol. Biol.* 2006; 319: 331–361. DOI: 10.1007/978-1-59259-993-6_17. PMID: 16719364
- Martínez-Vieyra V., Rodríguez-Varela M., García-Rubio D., De la Mora-Mojica B., Méndez-Méndez J., Durán-Álvarez C., Cerecedo D. Alterations to plasma membrane lipid contents affect the biophysical properties of erythrocytes from individuals with hypertension. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 2019; 1861 (10) 182996 DOI: 10.1016/j.bbmem.2019.05.018.
- Berezina T.L., Zaets S.B., Morgan C. Influence of storage on red blood cell rheological properties. *J. Surg. Res.* 2002; 102 (1): 6–12. DOI: 10.1006/jsre.2001.6306. PMID: 11792145
- Yusipovich A.I., Bryzgalova N.Y., Parshina E.Y., Lomakin A.G., Rodnenkov O.V., Levin G.G., Maksimov G.V., Rubin A.B. Evaluation of erythrocyte shape and status by laser interference microscopy. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2008; 145 (3): 382–385. DOI: 10.1007/s10517-008-0097-3. PMID: 19039950
- Betz T., Bakowsky U., Müller M., Lehr C.-M., Bernhardt I. Conformational change of membrane proteins leads to shape changes of red blood cells. *Bioelectrochemistry.* 2007; 70: 122–126. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2006.03.019. PMID: 16713378
- Cabral P. Effects of erythrocyte flexibility on microvascular perfusion and oxygenation during acute anemia. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2007; 293 (2): 1206–1215. DOI: 10.1152/ajpheart.00109.2007. PMID: 17449555
- Манченко Е. А., Козлова Е. К., Сергунова В. А., Черныш А. М. Однородная деформация нативных эритроцитов при их длительном хранении. *Общая реаниматология.* 2019; 15 (5): 2–10. DOI: 10.15360/1813-9779-2019-5-4-10
- Skoumalová A., Herget J., Wilhelm J. Hypercapnia protects erythrocytes against free radical damage induced by hypoxia in exposed rats. *Cell Biochem. Funct.* 2008; 26 (7): 801–807. DOI: 10.1002/cbf.1509. PMID: 18683905
- Girotti A.W., Thomas J.P. Damaging effects of oxygen radicals on resealed erythrocyte ghosts. *J. Biol. Chem.* 1984; 259 (3): 1744–1752. PMID: 6546380
- Vignini A., Alia S., Pugnali S., Giulietti A., Bacchetti T., Mazzanti L., Luzzi S., Fiorini R. Erythrocyte membrane fluidity in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease patients. *Exp. Gerontol.* 2019; 128: 110754. DOI: 10.1016/j.exger.2019.110754.
- Катюхин Л. Н. Реологические свойства эритроцитов. Современные методы исследования. *Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова.* 1995; 81 (6): 122–129.
- Котовская Ю. В. Метаболический синдром: прогностическое значение и современные подходы к комплексной терапии. *Сердце.* 2005; 4 (5): 236–241.
- Ройтберг Г. Е. Метаболический синдром. Москва: МЕДпресс-информ; 2007: 224. ISBN 5-98322-253-8
- Spyratou E., Dilvoi M., Patatoukas G., Platoni K., Makropoulou M., Efsthathopoulos E.P. Probing the Effects of Ionizing Radiation on Young's Modulus of Human Erythrocytes Cytoskeleton using Atomic Force Microscopy. *J. Med. Phys.* 2019; 44 (2): 113–117. DOI: 10.4103/jmp. JMP_95_18.
- Moroz V.V., Chernysh A.M., Kozlova E.K., Borshegovskaya P.Y., Bliznjuk U.A., Rysaeva R.M., Gudkova O.Y. Comparison of red blood cell membrane microstructure after different physicochemical influences: Atomic force microscope research. *J. Crit. Care.* 2010; 25 (3): 539. 1–12. DOI: 10.1016/j.jcrc.2010.02.007. PMID: 20381299
- Ji X.L., Ma Y.M., Yin T., Shen M.S., Xu X., Guan W. Application of atomic force microscopy in blood research. *World J. Gastroenterol.* 2005; 11 (11): 1709–1711. DOI: 10.3748/wjg.v11.i11.1709. PMID: 15786556
- Girasole M., Cricenti A., Generosi R., Congiu-Castellano A., Boffi F., Arcovito A., Boumis G., and Amiconi G. Atomic force microscopy study of erythrocyte shape and membrane structure after treatment with a dihydropyridine drug. *Appl. Phys. Lett.* 2000; 76: 3650–3652. DOI: 10.1063/1.126736
- Betz T., Bakowsky U., Müller M.R., Lehr C.M., Bernhardt I. Conformational change of membrane proteins leads to shape changes of red blood cells. *Bioelectrochemistry.* 2007; 70: 122–126. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2006.03.019. PMID: 16713378
- Zhang Y., Zhang W., Wang S., Wang C., Xie J., Chen X., Xu Y., Mao P. Detection of erythrocytes in patients with multiple myeloma using atomic force microscopy. *Scanning.* 2012; DOI: 10.1002/sca.21008. PMID: 22311545
- Мороз В. В., Черныш А. М., Козлова Е. К., Сергунова В. А., Гудкова О. Е., Федорова М. С., Кирсанова А. К., Новодержкина И. С. Нарушение наноструктуры мембран эритроцитов при острой кровопотере и их коррекция перфторуглеродной эмульсией. *Общая реаниматология.* 2011; 7 (2): 5–9. DOI: 10.15360/1813-9779-2011-2-5
- Khromova V.S., Myshkin A.E. Coagulation of zinc-modified hemoglobin. *Russian Journal of General Chemistry.* 2002; 72 (10): 1645–1649. DOI: 10.1023/A: 1023356221708
- Мороз В. В., Мягкова Е. А., Сергунова В. А., Гудкова О. Е., Остапченко Д. А., Черныш А. М., Решетняк В. И. Морфологические особенности эритроцитов у больных с тяжелой сочетанной травмой. *Общая реаниматология.* 2013; 9 (3): 14–23. DOI: 10.15360/1813-9779-2013-3-14

References

- Costa K.D. Imaging and probing cell mechanical properties with the atomic force microscope. *Meth. Mol. Biol.* 2006; 319: 331–361. DOI: 10.1007/978-1-59259-993-6_17. PMID: 16719364
- Martínez-Vieyra V., Rodríguez-Varela M., García-Rubio D., De la Mora-Mojica B., Méndez-Méndez J., Durán-Álvarez C., Cerecedo D. Alterations to plasma membrane lipid contents affect the biophysical properties of erythrocytes from individuals with hypertension. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 2019; 1861 (10) 182996 DOI: 10.1016/j.bbmem.2019.05.018.
- Berezina T.L., Zaets S.B., Morgan C. Influence of storage on red blood cell rheological properties. *J. Surg. Res.* 2002; 102 (1): 6–12. DOI: 10.1006/jsre.2001.6306. PMID: 11792145
- Yusipovich A.I., Bryzgalova N.Y., Parshina E.Y., Lomakin A.G., Rodnenkov O.V., Levin G.G., Maksimov G.V., Rubin A.B. Evaluation of erythrocyte shape and status by laser interference microscopy. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2008; 145 (3): 382–385. DOI: 10.1007/s10517-008-0097-3. PMID: 19039950
- Betz T., Bakowsky U., Müller M., Lehr C.-M., Bernhardt I. Conformational change of membrane proteins leads to shape changes of red blood cells. *Bioelectrochemistry.* 2007; 70: 122–126. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2006.03.019. PMID: 16713378
- Cabral P. Effects of erythrocyte flexibility on microvascular perfusion and oxygenation during acute anemia. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2007; 293 (2): 1206–1215. DOI: 10.1152/ajpheart.00109.2007. PMID: 17449555
- Manchenko E.A., Kozlova E.K., Sergunova V.A., Chernysh A.M. Homogeneous Deformation of Native Erythrocytes During Long-Term Storage. *Obshchaya Reanimatologiya=General Reanimatology.* 2019; 15 (5): 4–10. [In Russ.]. DOI: 10.15360/1813-9779-2019-5-4-10
- Skoumalová A., Herget J., Wilhelm J. Hypercapnia protects erythrocytes against free radical damage induced by hypoxia in exposed rats. *Cell Biochem. Funct.* 2008; 26 (7): 801–807. DOI: 10.1002/cbf.1509. PMID: 18683905
- Girotti A.W., Thomas J.P. Damaging effects of oxygen radicals on resealed erythrocyte ghosts. *J. Biol. Chem.* 1984; 259 (3): 1744–1752. PMID: 6546380
- Vignini A., Alia S., Pugnali S., Giulietti A., Bacchetti T., Mazzanti L., Luzzi S., Fiorini R. Erythrocyte membrane fluidity in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease patients. *Exp. Gerontol.* 2019; 128: 110754. DOI: 10.1016/j.exger.2019.110754.
- Katyuhin L.N. Rheological properties of erythrocytes. Modern research methods. *Rossiiskij fiziologicheskij zhurnal im. I.M. Sechenova.* 1995; 81 (6): 122–129 [In Russ.].
- Kotovskaya Yu.V. Metabolic syndrome: prognostic value and modern approaches to complex therapy. *Serdtshe.* 2005; 4 (5): 236–241 [In Russ.].
- Roytberg G.E. Metabolic syndrome. Moscow: MEDpress-inform; 2007: 224. ISBN 5-98322-253-8 [In Russ.].
- Spyratou E., Dilvoi M., Patatoukas G., Platoni K., Makropoulou M., Efsthathopoulos E.P. Probing the Effects of Ionizing Radiation on Young's Modulus of Human Erythrocytes Cytoskeleton using Atomic Force Microscopy. *J. Med. Phys.* 2019; 44 (2): 113–117. DOI: 10.4103/jmp. JMP_95_18.
- Moroz V.V., Chernysh A.M., Kozlova E.K., Borshegovskaya P.Y., Bliznjuk U.A., Rysaeva R.M., Gudkova O.Y. Comparison of red blood cell membrane microstructure after different physicochemical influences: Atomic force microscope research. *J. Crit. Care.* 2010; 25 (3): 539. 1–12. DOI: 10.1016/j.jcrc.2010.02.007. PMID: 20381299
- Ji X.L., Ma Y.M., Yin T., Shen M.S., Xu X., Guan W. Application of atomic force microscopy in blood research. *World J. Gastroenterol.* 2005; 11 (11): 1709–1711. DOI: 10.3748/wjg.v11.i11.1709. PMID: 15786556
- Girasole M., Cricenti A., Generosi R., Congiu-Castellano A., Boffi F., Arcovito A., Boumis G., and Amiconi G. Atomic force microscopy study of erythrocyte shape and membrane structure after treatment with a dihydropyridine drug. *Appl. Phys. Lett.* 2000; 76: 3650–3652. DOI: 10.1063/1.126736
- Betz T., Bakowsky U., Müller M.R., Lehr C.M., Bernhardt I. Conformational change of membrane proteins leads to shape changes of red blood cells. *Bioelectrochemistry.* 2007; 70: 122–126. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2006.03.019. PMID: 16713378
- Zhang Y., Zhang W., Wang S., Wang C., Xie J., Chen X., Xu Y., Mao P. Detection of erythrocytes in patients with multiple myeloma using atomic force microscopy. *Scanning.* 2012; DOI: 10.1002/sca.21008. PMID: 22311545
- Moroz V.V., Chernysh A.M., Kozlova E.K., Sergunova V.A., Gudkova O.E., Fedorova M.S., Kirsanova A.K., Novoderzhkina I.S. Impairments in the Nanostructure of Red Blood Cell Membranes in Acute Blood Loss and Their Correction with Perfluorocarbon Emulsion. *Obshchaya Reanimatologiya=General Reanimatology.* 2011; 7 (2): 5. (In Russ.) DOI: 10.15360/1813-9779-2011-2-5
- Khromova V.S., Myshkin A.E. Coagulation of zinc-modified hemoglobin. *Russian Journal of General Chemistry.* 2002; 72 (10): 1645–1649. DOI: 10.1023/A: 1023356221708
- Moroz V.V., Myagkova E.A., Sergunova V.A., Gudkova O.E., Ostapchenko D.A., Chernysh A.M., Reshetnyak V.I. Morphological Features of Red Blood Cells in Patients with Severe Concomitant Injury. *General Reanimatology=Obshchaya Reanimatologiya.* 2013; 9 (3): 14. (In Russ.) DOI: 10.15360/1813-9779-2013-3-14

23. Льюис С.М. Практическая гематология. Москва: ГЭОТАР-медиа; 2009: 672. ISBN 978-5-9704-1192-6
24. Robier C., Klescher D., Reicht G., Amouzadeh-Ghadikolai O., Quehenberger F., Neubauer M. Dacryocytes are a common morphologic feature of autoimmune and microangiopathic haemolytic anaemia. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2015; 53 (7): 1073–1076. DOI: 10.1515/cclm-2014-0936. PMID: 25503671
25. Сергунова В.А., Манченко Е.А., Гудкова О.Е. Гемоглобин: модификации, кристаллизация, полимеризация (обзор). *Общая реаниматология*. 2016; 12 (6): 49–63. DOI: 10.15360/1813-9779-2016-6-49-63
26. Lim H. W. G., Wortis M., Mukhopadhyay R. Stomatocyte–discocyte–echinocyte sequence of the human red blood cell: Evidence for the bilayer couple hypothesis from membrane mechanics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002; 99 (26): 16766–16769. DOI: 10.1073/pnas.202617299. PMID: 12471152
27. Kozlova E, Chernysh A, Moroz V, Sergunova V, Gudkova O, Manchenko E. Morphology, membrane nanostructure and stiffness for quality assessment of packed red blood cells. *Sci. Rep.* 2017; 7 (1): 7846. DOI: 10.1038/s41598-017-08255-9. PMID: 28798476
28. Ишутина Н. А., Андриевская И. А. Изменение показателей свободно-радикального статуса, антиоксидантной защиты и морфологические изменения эритроцитов периферической крови беременных первого триместра с цитомегаловирусной инфекцией. *Бюллетень физиологии и патологии дыхания*. 2018; 68: 57–62. DOI: 10.12737/article_5b18ba014d2d06.81485843
29. Львов С.Е., Назаров С.Б., Молчанов О.С., Пахрова О.А. Особенности поверхностной архитектоники эритроцитов при заболеваниях тазобедренного сустава. *Вестник Ивановской медицинской академии*. 2008; 13 (1–2): 46–49.
30. Chignard M., Le Couedic J. P., Tence M., Vargaftig B. B., Benveniste J. The role of platelet-activating factor in platelet aggregation. *Nature*. 1979; 279: 799–800. DOI: 10.1038/279799a0
23. Lyuis S.M. Practical Hematology. Moscow: GEOTAR-media; 2009: 672. ISBN 978-5-9704-1192-6 [In Russ.]
24. Robier C, Klescher D, Reicht G, Amouzadeh-Ghadikolai O, Quehenberger F, Neubauer M. Dacryocytes are a common morphologic feature of autoimmune and microangiopathic haemolytic anaemia. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2015; 53 (7): 1073–1076. DOI: 10.1515/cclm-2014-0936. PMID: 25503671
25. Sergunova V.A., Manchenko E.A., Gudkova O.Y. Hemoglobin: Modification, Crystallization, Polymerization (Review). *Obshchaya Reanimatologiya=General Reanimatology*. 2016; 12 (6): 49–63. (In Russ.) DOI: 10.15360/1813-9779-2016-6-49-63
26. Lim H. W. G., Wortis M., Mukhopadhyay R. Stomatocyte–discocyte–echinocyte sequence of the human red blood cell: Evidence for the bilayer couple hypothesis from membrane mechanics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002; 99 (26): 16766–16769. DOI: 10.1073/pnas.202617299. PMID: 12471152
27. Kozlova E, Chernysh A, Moroz V, Sergunova V, Gudkova O, Manchenko E. Morphology, membrane nanostructure and stiffness for quality assessment of packed red blood cells. *Sci. Rep.* 2017; 7 (1): 7846. DOI: 10.1038/s41598-017-08255-9. PMID: 28798476
28. Ishutina N. A., Andrievskaya I. A. Changes in indicators of free-radical status, antioxidant defense, and morphological changes in peripheral red blood cells of pregnant women in the first trimester with cytomegalovirus infection. *Byulleten fiziologii i patologii dykhaniya*. 2018; 68: 57–62. [In Russ.] DOI: 10.12737/article_5b18ba014d2d06.81485843
29. Lvov S.E., Nazarov S.B., Molchanov O.S., Pakhrova O.A. Features of the surface architectonics of red blood cells in diseases of the hip joint. *Vestnik Ivanovskoy medicinskoj akademii*. 2008; 13 (1–2): 46–49. [In Russ.]
30. Chignard M., Le Couedic J. P., Tence M., Vargaftig B. B., Benveniste J. The role of platelet-activating factor in platelet aggregation. *Nature*. 1979; 279: 799–800. DOI: 10.1038/279799a0

Поступила 03.07.19

Received 03.07.19

Первое успешное внедрение семейно-ориентированной медицинской помощи в отделении интенсивной терапии детского стационара Республики Казахстан (сообщение)

А. И. Сапаров, В. Г. Сазонов, З. С. Тобылбаева, Г. Б. Карина,
М. Н. Курочкин, Д. К. Беремжанова, А. З. Мұстафа

Национальный научный центр материнства и детства Корпоративного фонда «Университетский медицинский центр»,
Казахстан, 010000, г. Нур-Султан, ул. Туран, д. 32

The First Successful Implementation of Family-Centered Health Care in Pediatric Intensive Care Unit in Republic of Kazakhstan (Report)

Askhat I. Saparov, Vitaly G. Sazonov, Zauze S. Tobylbaeva, Gauhar B. Karina,
Mikhail N. Kurochkin, Didar K. Beremzhanova, Aizhan Z. Mұstafa

National Research Center for Maternity and Childhood, Corporate Fund «University medical Center»,
32 Turan Str., 010000 Nur-Sultan, Kazakhstan

В Лейденской хартии прав детей, находящихся в больнице (Европейская ассоциация по защите прав детей, находящихся в больницах (European Association for Children in Hospital, EACH, 1988 г.), закреплено право на то, чтобы родители или лица, их замещающие, были рядом с ними все время.

В данном сообщении представили технологическую цепь осуществления модели совместного пребывания (МСП) пациента с родителями/опекунами в отделении детской анестезиологии реанимации и интенсивной терапии (ОДАРИТ).

Цель сообщения: продемонстрировать способ повышения безопасности пациента и прозрачности проведения интенсивной терапии, внедрения активного ухода за пациентом путем «двойного контроля».

Внедрение МСП способствовало выработке доверительного взаимодействия родителей/опекунов и медицинского персонала, приобретению навыков правильного ухода за своим ребенком.

Круглосуточная семейно-ориентированная помощь в ОДАРИТ положительно оценена родителями/опекунами и, по предварительным данным, способствует стабилизации состояния и улучшению самочувствия пациентов.

Ключевые слова: Республика Казахстан; Национальный научный центр материнства и детства; семейно-ориентированная медицинская помощь; детское отделение; анестезиология; реанимация; интенсивная терапия; семейно-ориентированная медицинская помощь

The Leiden Charter for Children in Hospital states that children in hospital shall have the right to have their parents or parent substitute with them at all times (European Association for Children in Hospital (EACH) 1988).

In this report, the technology chain for the implementation of the patient's parent/guardian resident stay model (RSM) in pediatric anesthesiology, resuscitation and intensive care unit (PARICU) was presented.

The aim of the report was to share the experience in improving patient safety and transparency of intensive care and introducing the active patient care through a «double control».

The implementation of RSM has contributed to building a trustful interaction between parents/guardians and medical staff, developing skills for the proper care of children.

The 24-hour family-centered care in PARICU was favorably evaluated by parents/guardians and, according to preliminary data, helped to stabilize the condition and improve the well-being of patients.

Keywords: Republic of Kazakhstan; National Scientific Center of Maternity and Childhood; pediatric unit; anesthesiology, resuscitation; intensive care; family-centered healthcare

DOI:10.15360/1813-9779-2019-6-21-25

Введение

Исторически сложилось, что отделения реанимации в общем, и отделения детской реанимации в частности, проводили ограничен-

Introduction

Historically, the intensive care units in general, and pediatric intensive care units in particular, have pursued a policy of limited visits, allowing

Адрес для корреспонденции:

Зауре Сакановна Тобылбаева
E-mail: z.tobylbayeva@gmail.com

Correspondence to:

Zauze S. Tobylbayeva
E-mail: z.tobylbayeva@gmail.com

ную политику посещений, разрешая только кратковременные визиты близких родственников, и то не во всех случаях [1].

Проблемы, лежащие в основе этих ограничительных мер, включали возможность распространения инфекции; нарушение неприкосновенности частной жизни и конфиденциальности, эмоциональную травму пациентов, родителей и членов семьи, а также нехватку места и персонала для размещения семьи. Тем не менее, исследования потребностей семей критически больных пациентов показывают, что семьям нужна информация, уверенность в действиях персонала и близость к своим родным [3].

Природная задача родителей/опекунов осуществлять заботу о своих детях. Но в то время, когда ребенок тяжело болен, в связи со специальными потребностями и возникшими сложностями, большая часть ухода и заботы передается медицинскому персоналу. Это и является основным источником стресса для родителей/опекунов и детей [4].

Огромное значение, которое придается возможности присутствия родителей/опекунов рядом с болеющим ребенком, отражено в Лейденской хартии прав детей, находящихся в больнице. Данный документ принят Европейской ассоциацией по защите прав детей, находящихся в больнице (EACH), в 1988 г. и дополнен комментариями в 2001 г., в Брюсселе, на 7-й конференции EACH [5]. Согласно статье 2 Лейденской хартии, дети, находящиеся в больнице, имеют право на то, чтобы их родители или лица, их замещающие, были рядом с ними все время.

Несмотря на наличие законодательной базы и ресурсов, в Республике Казахстан модель совместного пребывания (МСП) пациентов и родителей/опекунов в настоящее время по ряду субъективных причин не распространена.

Национальный научный центр материнства и детства Республики Казахстан принял политику открытого круглосуточного посещения пациентов ОДАРИТ родителями/опекунами, рассматривая это как первый шаг в продвижении присутствия семьи рядом с пациентом, и ее вовлеченности в уход за ним. Работу в этом направлении начали с 26 ноября 2018 года: наметили поэтапный план внедрения МСП пациента с родителями/опекунами в ОДАРИТ.

Описание МСП пациента с родителями/опекунами в ОДАРИТ

Семейно-ориентированная медицинская помощь имеет цель: повысить безопасность и соблюдение прав пациентов при проведении интенсивной терапии; обучить родителей/опекунов правильному уходу за своим ребенком в палате интенсивной терапии; обеспечить активное доверительное взаимодействие родителей/опекунов и медицинского персонала.

only short-term visits by close relatives, and not in all cases [1].

The rationale for these restrictive measures included the risk of infection transmission; privacy and confidentiality issues; emotional trauma to patients, parents and family members; and lack of space and staff to accommodate the family. However, studies of the needs of families of critically ill patients show that families need information, confidence in the staff practices and proximity to their loved ones [3].

Caring for their children is a natural task for parents/guardians. However, when a child is seriously ill, due to special needs and difficulties, most of the care and support is delegated to medical staff. This is the main source of stress for parents/guardians and children [4].

The enormous importance of the presence of parents/guardians near a sick child is highlighted in the Leiden Charter for Children in Hospital. This document was adopted by the European Association for Children in Hospital (EACH) in 1988 and supplemented by commentaries at the 7th EACH Conference in Brussels in 2001 [5]. According to Article 2 of the Leiden Charter, children in hospital have the right to have their parents or guardians with them at all times.

Despite the legal framework and resources, resident stay model (RSM) of patients and parents/guardians in the Republic of Kazakhstan is not currently widespread due to a number of subjective reasons.

The National Center for Maternity and Childhood Research of the Republic of Kazakhstan has adopted a policy of open 24-hour visits to patients by parents/guardians, viewing this as a first step in promoting family presence and involvement in patient care. Work in this direction began on November 26, 2018 when a step-by-step plan for the implementation of patient RSM with parents/guardians in PARICU was outlined.

Description of the patient RSM with parents/guardians in pediatric anesthesiology, resuscitation and intensive care unit (PARICU)

The family-centered health care aims to improve the safety and human rights protection in intensive care, to provide training to parents/guardians in the proper care of their child in the intensive care ward, and to ensure an active trusting interaction between parents/guardians and medical staff.

The technical implementation of the patient RSM with parents/guardians in PARICU consists of the following key actions:

1. As soon as the child is admitted (transferred) to PARICU, the parents/guardians are informed about the possibility of staying together; they sign an informed consent.
2. The parents/guardians determine the duration of their stay at PARICU; they may be absent for taking meals, sanitary needs, and rest.

Техническое осуществление МСП пациента с родителями/опекунами в ОДАРИТ представляет собой следующие основные действия:

1. В момент поступления (перевода) ребенка в ОДАРИТ родителей/опекунов информируют о возможности совместного пребывания; они подписывают информированное согласие.

2. Время своего пребывания в ОДАРИТ определяют родители/опекуны; они могут отлучаться для приема пищи, осуществления гигиенических нужд, отдыха.

3. На входе в ОДАРИТ родители/опекуны надевают одноразовый медицинский халат, шапочку, маску, при необходимости — бахилы; родителям рекомендуется быть одетыми в чистую одежду из натуральных, предпочтительно хлопчатобумажных материалов.

4. Обработку рук кожным антисептиком родители/опекуны осуществляют согласно внутренним правилам клиники и ОДАРИТ, а именно: перед входом в отделение и при выходе из него, перед и после контакта с пациентом, перед любой процедурой и после нее, при контакте с биологическими жидкостями, при любом внешнем загрязнении.

5. Ограничение личного пространства пациента и родителей/опекунов в отделении, исключение зрительного контакта с другими пациентами и их семьями обеспечивается ширмами.

6. После обучения родители/опекуны осуществляют простые элементы ухода и манипуляции, такие как: гигиеническая обработка кожных покровов, уход за полостью рта, глазами и т. д.; смена положения тела для кормления пациента, профилактику пролежней; уход за трахеостомой; санацию верхних дыхательных путей; энтеральное, в том числе зондовое, кормление; действия при рвоте; учет баланса и другие манипуляции, по согласованию с медицинским персоналом.

7. Родители/опекуны оказывают помощь персоналу при выполнении манипуляций (перевязка, очистительная клизма, смена постельного белья и т.д.) и применении элементов мониторинга (наложение манжетки для измерения артериального давления, датчика пульсоксиметра).

8. Родители/опекуны приобретают навыки использования прикроватного монитора слежения и интерпретации основных значений, в случае необходимости и отклонения значений, срабатывании тревоги на аппаратуре (мониторах, перфузорах, аппаратах искусственной вентиляции) незамедлительно сообщают медицинскому персоналу.

9. Родители/опекуны имеют право: обращаться к медицинскому персоналу по всем вопросам, касающимся: ухода за пациентом, плана лечения и проводимых исследований, их результатов и по другим возникшим проблемам; присутствовать во время обходов, консилиумов и задавать вопросы участникам обхода или консилиума.

10. Родители/опекуны покидают отделение при проведении инвазивных манипуляций, осуществлении реанимационных мероприятий;

11. При необходимости и по требованию родители/опекуны получают профессиональную психологическую помощь.

12. Родители/опекуны строго и неукоснительно следуют указаниям медицинского персонала отделения.

3. At the entrance to PARICU, parents/guardians are required to wear a disposable medical gown, cap, mask and, if necessary, shoe covers; parents are advised to wear clean clothing made of natural materials, preferably cotton.

4. Parents/guardians should treat their hands with skin antiseptic according to the local policy of the clinic and PARICU, i.e. before entering and on leaving the ward, before and after contact with the patient, before and after any procedure, in case of contact with biological fluids or any external contamination.

5. Private space for the patient and parents/guardians in the ward with no visual contact with other patients and their families is provided by using screens.

6. After training, parents/guardians perform simple care manipulations, such as sanitary skin, mouth, eye care, etc.; change of body position for feeding the patient, prevention of pressure sores; care of the tracheostoma; sanitation of the upper respiratory tract; enteric feeding, including tube feeding; handling vomiting; recording fluid intake and output, and other manipulations, in agreement with the medical staff.

7. Parents/guardians assist staff in performing manipulations (bandaging, cleansing enema, change of bed linen, etc.) and in using monitoring items (placement of cuffs for blood pressure measurement or pulse oximeter sensor).

8. Parents/guardians acquire skills of using a bedside monitor and interpretation of its basic measurements, in case of necessity or abnormal values, if activation of the alarm mode of the equipment (monitors, perfusors, ventilators) happens, they immediately inform the medical staff.

9. Parents/guardians have the right to contact medical staff with any questions regarding patient care, treatment plan and investigations, their results, and other problems encountered; to be present during rounds, consultations, and to ask questions to the participants.

10. Parents/guardians leave the ward during invasive procedures or resuscitation interventions.

11. If necessary and upon request, parents/guardians are provided with professional psychological support.

12. Parents/guardians shall strictly and rigorously follow the instructions of the medical staff of the department.

Results and Discussion

Since the implementation of RSM with parents/guardians in PARICU, based on the principle of «open resuscitation», the activity has been monitored and evaluated. The survey with participation of 127 parents/guardians showed that 100% of interviewees fully agree with the importance of staying with the child in PARICU for the patient's family. The opportunity to ask questions during rounds in the presence of parents/guardians was highly appreciated. The interviewees stated that they had no difficulty in following the rules and instructions adopted by PARICU and were comfortable with them.

The main advantages of patient RSM with parents/guardians are:

- increasing the level of communication between parents/guardians and medical staff;
- improving the discipline of medical staff;
- reducing complications associated with the «neglect»;

Предварительные результаты

С момента внедрения МСП детей с родителями/опекунами в ОДАРИТ, основанной на принципе «открытой реанимации», проводили мониторинг и оценку данной практики. По результатам анкетирования 127 родителей/опекунов пациентов выявили, что 100% опрошенных полностью согласны с важностью совместного пребывания с ребенком в ОДАРИТ для семьи пациента. Высоко оценена возможность задать вопросы во время обходов в присутствия родителей/опекунов. Опрошенные отмечают, что следовать правилам и инструкциям, принятым в ОДАРИТ, не трудно и с пониманием относятся к ним.

Основными преимуществами внедрения МСП пациента с родителями/опекунами являются:

- повышение уровня культуры коммуникаций родителей/опекунов пациентов и медперсонала;
- повышение дисциплины медперсонала;
- снижение осложнений, связанных с «дефектом ухода»;
- овладение специальными навыками ухода за пациентом при обучении родителей/опекунов в условиях отделения реанимации, способствующее правильно и эффективно продолжать уход за своим ребенком при его переводе в профильное отделение.

Увеличилось количество положительных отзывов родителей/опекунов о работе медперсонала, что связано с возможностью непосредственного наблюдения процесса лечения в условиях ОДАРИТ.

На раннем этапе внедрения МСП пациентов и родителей/опекунов отметили, что медперсонал стал затрачивать больше времени на разъяснение текущей ситуации и состояния пациента, даже тогда, когда состояние стабильное. В условиях МСП родители/опекуны пациента могут задавать большее количество вопросов, что зачастую отвлекает и мешает сконцентрироваться врачу на определенном моменте лечения и даже своевременном выполнении назначений. Нужно принимать во внимание, что нахождение родителей/опекунов в отделении может быть дополнительным фактором стресса для медицинского персонала.

В некоторых случаях, при длительном совместном пребывании родителей/опекунов в отделении отмечено, что они оценивают качество работы медперсонала по стажу, выбирают опытных медсестер для выполнения медицинских манипуляций.

Персонал отделения может столкнуться с требованием предоставления возможности пребывания одновременно обоих родителей, что технически сложно для осуществления.

— mastering special skills of patient care when training parents/guardians in the intensive care unit, contributing to the proper and effective continuation of care for the child upon his/her transfer to the specialized unit.

The number of positive feedbacks from parents/guardians about the work of the medical staff has increased, due to the possibility of direct observation of the treatment process in the PARICU.

In the early stage of RSM implementation, the medical staff was found to spend more time explaining the current situation and the patient's condition, even if the condition was stable. In the RSM context, the patient's parents/guardians can ask more questions, which often interferes with the clinician's ability to concentrate on a certain point of treatment and even timely prescribing. Consideration should be given to the fact that the presence of parents/guardians in the ward may be an additional stressor for medical staff.

In some cases, when parents/guardians were in the ward together for prolonged periods of time, they were found to assess the quality of the medical staff's work by length of service and to select experienced nurses to perform medical procedures. The staff of the ward may be facing the demand for the possibility of both parents to stay at the same time, which is technically difficult to accomplish.

The use of disinfectants and disposables (gowns, caps and masks) has increased predictably.

Conclusion

The results of the anonymous survey of parents/guardians confirmed the positive outlook for the implementation of RSM. They have shown that 100% of the participants highly appreciate the possibility of staying together in PARICU. Staying together allows watching the work of each employee of the ward, and parents/guardians have the opportunity to appreciate the work of medical staff and develop skills of caring for their child. Interviewees are confident that the introduction of RSM will help to stabilize the condition and improve the well-being of patients.

Предсказуемо увеличился расход дезинфицирующих растворов и одноразовых средств (халатов, шапочек, масок).

Заклучение

Результаты анонимного анкетирования родителей/опекунов подтвердили положительный прогноз внедрения МСП. Их анализ показал, что 100% опрошенных высоко оценивают возможность совместного пребывания в ОДАРИТ. Совместное пребывание позволяет видеть работу каждого сотрудника отделения, и родители/опекуны имеют возможность оценить труд медицинского персонала, получить

навыки ухода за своим ребенком. Опрошенные уверены, что внедрение МСП способствует

стабилизации состояния и улучшению самочувствия пациентов.

Литература

1. Frazier A., Frazier H., Warren N. AA discussion of family-centered care within the pediatric intensive care unit. *Crit Care Nurs Q.* 2010; 33 (1): 82–86. DOI: 10.1097/CNQ.0b013e3181c8e015
2. Scott L.D. Perceived needs of parents of critically ill children. *J. Soc. Pediatr. Nurs.* 1998; 3 (1): 4–12. DOI: 10.1111/j.1744-6155.1998.tb00203.x
3. Meert K.L., Schim S.M., Briller S.H. Parental bereavement needs in the pediatric intensive care unit: review of available measures. *J. Palliat. Med.* 2011; 14 (8): 951–964. DOI: 10.1089/jpm.2010.0453
4. Macdonald M.E., Liben S., Carnevale F.A., Cohen S.R. An office or a bedroom? Challenges for family-centered care in the pediatric intensive care unit. *J. Child. Health Care.* 2012; 16 (3): 237–249. PMID: 22308544 DOI: 10.1177/1367493511430678
5. Хартия европейской ассоциации по защите прав детей, находящихся в больницах, European Association for Children in Hospital (EACH), 1988, www.each-for-scik-children.org

Поступила 31.05.19

References

1. Frazier A., Frazier H., Warren N. AA discussion of family-centered care within the pediatric intensive care unit. *Crit Care Nurs Q.* 2010; 33 (1): 82–86. DOI: 10.1097/CNQ.0b013e3181c8e015
2. Scott L.D. Perceived needs of parents of critically ill children. *J. Soc. Pediatr. Nurs.* 1998; 3 (1): 4–12. DOI: 10.1111/j.1744-6155.1998.tb00203.x
3. Meert K.L., Schim S.M., Briller S.H. Parental bereavement needs in the pediatric intensive care unit: review of available measures. *J. Palliat. Med.* 2011; 14 (8): 951–964. DOI: 10.1089/jpm.2010.0453
4. Macdonald M.E., Liben S., Carnevale F.A., Cohen S.R. An office or a bedroom? Challenges for family-centered care in the pediatric intensive care unit. *J. Child. Health Care.* 2012; 16 (3): 237–249. PMID: 22308544 DOI: 10.1177/1367493511430678
5. Charta of European Association for Children in Hospital. European Association for Children in Hospital (EACH), 1988, [In Russ.]

Received 31.05.19

Глиоцитоархитектоника зубчатой фассии и поля СА4 гиппокампа головного мозга белых крыс после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий

А. В. Горбунова, Д. Б. Авдеев, С. С. Степанов, В. А. Акулинин,
А. С. Степанов, А. Ю. Шоронова, А. А. Самсонов

Омский государственный медицинский университет Минздрава России,
Россия, 644099, г. Омск, ул. Ленина, д. 12

Glial Cell Architecture Dynamics in Dentate Gyrus and CA4 Area of Wistar Rat Hippocampus Following 20-minute Occlusion of Common Carotid Arteries

Anna V. Gorbunova, Dmitry B. Avdeev, Sergey S. Stepanov, Victor A. Akulinin,
Alexander S. Stepanov, Anastasia Yu. Shoronova, Artem A. Samsonov

Omsk State Medical University, Ministry of Health of Russia,
12 Lenin Str., 644099 Omsk, Russia

Цель: изучение распределения и пространственной организации астроцитов зубчатой фассии (ЗФ) и поля СА4 гиппокампа белых крыс в норме и после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий (ООСА).

Методы исследования. Использовали гистологические (окраска гематоксилином и эозином, по Нисслю), иммуногистохимические (GFAP, MAP-2) и морфометрические методы. На тонких (4 мкм) серийных фронтальных срезах гиппокампа изучали астроциты и нейроны в контроле (ложнооперированные животные, $n=5$), через 6 часов ($n=5$), 1 ($n=5$), 3 ($n=5$), 7 ($n=5$), 14 ($n=5$) и 30 суток ($n=5$) после 20-минутной ООСА. Для получения дополнительной количественной информации о пространственной организации астроцитарных сетей использовали фрактальный анализ (ImageJ 1.52; плагин FracLac 2.5). Статистические гипотезы проверили с помощью непараметрических критериев.

Результаты. Через 30 суток после 20-минутной ООСА отмечали необратимую деструкцию только 5,3 % нейронов СА4 и сохранение общей численной плотности гранулярных клеток ЗФ на контрольном уровне. Уже через 6 часов и 1 сутки после ООСА отмечали гипертрофию и усложнение пространственной организации отростков астроцитов, которые сохранялись на протяжении 30 суток. Астроглиоз сопровождался увеличением относительной площади GFAP-позитивного материала, фрактальной размерности и уменьшением лакунарности астроцитарной сети. Особенно наглядно последнее проявлялось через 1, 14 и 30 суток после ООСА.

Заключение. После 20-минутной ООСА в зубчатой фассии и СА4 увеличивалась плотность GFAP-позитивного материала, усложнялась реорганизация фиброархитектоники за счет разветвления отростков астроцитов. При этом общая численная плотность нейронов изменялась незначительно. Все это свидетельствовало о вероятной роли астроцитов при постишемической активации механизмов естественной нейропротекции.

Ключевые слова: острая ишемия; гиппокамп; астроциты; иммуногистохимия; GFAP, MAP-2; фрактальный анализ

Aim. To study the distribution and spatial organization of dentate gyrus (DG) astrocytes and CA4 area of hippocampus of Wistar rats following 20-minute occlusion of common carotid arteries (OCCA) compared to sham-operated control animals.

Material and methods. Histological (Nissl staining with hematoxylin and eosin), immunohistochemical (GFAP, MAP-2) and morphometric methods were used. Astrocytes and neurons in control (sham-operated animals, $n=5$) group, after 6 hours ($n=5$), 1 days ($n=5$), 3 days ($n=5$), 7 days ($n=5$), 14 days ($n=5$) and 30 days ($n=5$) after 20-minute OCCA were studied on thin (4 μ m) serial frontal sections of the hippocampus. Fractal analysis (ImageJ 1.52; fractalac 2.5 plugin) was used to obtain additional quantitative information on the spatial organization of astrocyte networks. Statistical hypotheses were tested using nonparametric criteria.

Results. 30 days after the 20-minute OCCA, only 5.3% of CA4 neurons were irreversibly destroyed and the total numerical density of DG granular cells remained at the control level. Hypertrophy and increased com-

Адресс для корреспонденции:

Дмитрий Борисович Авдеев
E-mail: avdeev86@inbox.ru

Correspondence to:

Dmitry B. Avdeev
E-mail: avdeev86@inbox.ru

plexity of the spatial organization of astrocyte processes were observed 6 hours and 1 day after OCCA and persisted for 30 days. Astrogliosis was accompanied by an increased relative area of GFAP-positive material and fractal dimension and reduced lacunarity of the astrocyte network. The latter was especially evident in 1, 14 and 30 days after the OCCA.

Conclusion. After the 20-minute OCCA, the density of GFAP-positive material increased, the fibroarchitecture reorganized and gained more complexity due to the branching of astrocyte processes. At the same time, the total numerical density of neurons changed only slightly. All this indicated the probable role of astrocytes in post-ischemic activation of natural neuroprotection mechanisms.

Keywords: acute ischemia; hippocampus; astrocytes; immunohistochemistry; GFAP, MAP-2; fractal analysis

DOI:10.15360/1813-9779-2019-6-26-37

Введение

У млекопитающих гиппокампальная формация состоит из двух С-образных взаимодействующих образований — зубчатой извилина/фасции (ЗФ) и полей CA1–CA4 собственно гиппокампа. ЗФ охватывает область хилуса, которая содержит полиморфный клеточный слой CA4 и проксимальную часть пирамидального клеточного слоя CA3. То есть, топографически ЗФ, CA3 и CA4 объединены в едином структурно-функциональном комплексе [1–3].

В настоящее время имеются данные, свидетельствующие о том, что в ЗФ взрослого мозга млекопитающих формируются новые нейроны, которые участвуют в процессах обучения и памяти через интеграцию в ранее существовавшие нейронные сети. Это вызывает повышенный интерес к изучению всех особенностей структурно-функциональной организации ЗФ [4, 5]. Каждая из областей гиппокампа имеет свою уникальную структуру и функцию. Различия касаются морфологии нейронов, синаптической пластичности, нейромедиаторов, способности к нейрогенезу, чувствительности к различным повреждениям (включая и ишемию), а также реакции на фармакологические препараты [6]. Большое внимание уделяется изучению астроцитов и микроглиоцитов гиппокампа млекопитающих в норме и при различных патологических состояниях головного мозга [7–10]. Иммуногистохимическая реакция на GFAP позволяет надежно идентифицировать астроциты в нервной ткани [11].

Установлено, что в ответ на черепно-мозговую травму, ишемию, нейродегенерацию изменяется функция и морфология астроцитов. В зависимости от характера воздействия, реакция астроглии может быть очаговой, диффузной или смешанной, проявляться как атрофия, гипертрофия, реактивный и патологический астроглиоз [7, 10–12]. Однако, структурные изменения, лежащие в основе ремоделирования астроцитов гиппокампа после 20-минутной окклюзии сонных артерий требуют дальнейшего изучения.

Ранее мы показали, что после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий (ООСА)

Introduction

In mammals, the hippocampal formation consists of two C-shaped interpenetrating formations: the dentate fascia/gyrus (DG) and the CA1–CA4 areas of the hippocampus itself. The dentate gyrus covers the chylus region, which contains the polymorphic cell layer CA4 and the proximal portion of the pyramidal cell layer CA3. Thus, topographically, DG, SA3 and SA4 are united in a single structural and functional complex [1–3].

Currently, there is evidence that new neurons, involved in learning and memory processes through integration into pre-existing neural networks, are formed in the DG of the adult mammalian brain. This attracts increased interest in the study of all the features of the structural and functional organization of DG [4, 5]. Each area of the hippocampus has its own unique structure and function. The differences relate to neuron morphology, synaptic plasticity, neurotransmitters, neurogenesis ability, sensitivity to various injuries (including ischemia), as well as response to pharmacological drugs [6]. Considerable attention is given to studying astrocytes and microglyocytes of the mammalian hippocampus in normal and in various pathological conditions of the brain [7–10]. Immunohistochemical reaction to GFAP allows reliable identification of astrocytes in nervous tissue [11].

Astrocyte function and morphology were found to change in response to traumatic brain injury, ischemia, and neurodegeneration. Depending on the nature of the impact, the reaction of astroglia can be focal, diffuse or mixed, manifested as atrophy, hypertrophy, reactive and pathological astroglia [7, 10–12]. However, the structural changes underlying the remodeling of hippocampal astrocytes after 20-minute carotid artery occlusion require further study.

Previously, we showed that after 20-minute occlusion of the common carotid arteries (OCCA), moderate diffuse-focal pathological, adaptive and reparative changes in neurons and astrocytes developed [13, 14]. Other studies have been focused on the structural and functional features of astrocytes after focal necrotic changes of neurons with marked manifestations of pathological astrogliosis [11].

развивались умеренные диффузно-очаговые патологические, адаптивные и репаративные изменения нейронов и астроцитов [13, 14]. В работах других авторов преимущественно исследовалось структурно-функциональное состояние астроцитов после очаговых некротических изменений нейронов, когда отмечались выраженные проявления патологического астроглиоза [11].

По литературным данным, для оценки астроцитарных сетей можно использовать фрактальный анализ. Этот метод позволяет количественно описать качественные характеристики сложной фрактальной или фракталоподобной структуры (например, нейроны, астроциты) путем расчета фрактальной размерности (ФР) — показателя заполнения пространства фрактальной структурой и лакулярности (Λ) — меры неоднородности заполнения пространства фрактальной структурой. Поэтому этот метод нашел широкое применение как мера структурной сложности природных объектов, в том числе и нервных клеток [11, 15, 16]. Однако астроцитарная сеть гиппокампа после 20-минутной ООСА в таком аспекте не изучалась. Выбор для исследования зубчатой фации и поля СА4 обусловлен их топографическим единством, высокой устойчивостью к ишемии и недостаточной изученностью астроцитов данных отделов гиппокампальной формации.

Поэтому целью настоящего исследования было изучение распределения и пространственной организации астроцитов зубчатой фации и поля СА4 гиппокампа белых крыс в норме и после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий.

Материал и методы

Работу выполнили на базе ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет», одобрена этическим комитетом университета (протокол №112 от 26 сентября 2019 года). В качестве экспериментальных животных использовали крыс линии Wistar массой 180–200 гр. Исследования проводили в соответствии с рекомендациями Международного комитета по работе с лабораторными животными, поддержанных ВОЗ, директивой Европейского Парламента № 2010/63/EU от 22.09.10 «О защите животных, используемых для научных целей».

Острую 20-минутную ишемию мозга моделировали путем окклюзии общих сонных артерий (ООСА, 2-сосудистая модель неполной глобальной ишемии без гипотонии) на фоне премедикации (сульфат атропина 0,1 мг/кг, подкожно) и общей анестезии (Zoletil® 100, 10 мг/кг). Выбор данной модели был обусловлен тем, что она, в отличие от других, не сопровождается появлением крупных очагов необратимого повреждения головного мозга крыс [17–19].

Материал для морфологического исследования забирали через 6 часов ($n=5$), 1 ($n=5$), 3 ($n=5$), 7

According to the literature, fractal analysis can be used to evaluate astrocyte networks. This method allows to quantitatively describe the qualitative features of complex fractal or fractal-like structures (e.g., neurons, astrocytes) by calculating the fractal dimension (FD) which is a measure of space-filling fractal structure and lacunarity (Λ) which is a measure of the inhomogeneity of space-filling fractal structure. Therefore, this method has been widely used as a measure of the structural complexity of natural objects, including nerve cells [11, 15, 16]. However, the astrocytic network of the hippocampus after 20-minute OCCA in this aspect has not been studied. The choice for the study of dentate gyrus and CA4 area is due to their topographic unity, high resistance to ischemia and insufficient study of astrocytes of these hippocampal areas.

Therefore, the aim of this study was to explore the distribution and spatial organization of astrocytes of the dentate gyrus and the CA4 area of the hippocampus of albino Wistar rats following 20-minute occlusion of the common carotid arteries compared to sham-operated control animals.

Materials and Methods

The work was performed at the Omsk State Medical University, approved by the Ethical Committee of the University (Protocol No. 112 of September 26, 2019). Wistar rats weighing 180–200 g were used in experimental studies. The studies were carried out in accordance with the recommendations of the International Committee for work with laboratory animals supported by WHO and Directive of the European Parliament No. 2010/63/EU of 22.09.10 on the protection of animals used for scientific purposes.

Acute 20-minute cerebral ischemia was modeled by occlusion of common carotid arteries (OCCA, 2-vascular model of incomplete global ischemia without hypotension) with premedication (atropine sulfate 0.1 mg / kg, subcutaneously) and General anesthesia (Zoletil® 100, 10 mg/kg). This model was chosen because, unlike others, it is not accompanied by the appearance of large foci of irreversible brain damage in rats [17–19].

The material for morphological study was collected 6 hours ($n=5$), 1 ($n=5$), 3 ($n=5$), 7 ($n=5$), 14 ($n=5$) and 30 ($n=5$) days after OCCA. The control group ($n=5$) included sham-operated (without OCCA) animals. The brain was fixed by perfusion of 4% paraformaldehyde solution on 0.1 M phosphate buffer (pH=7.4) through the ascending part of the aortic arch. The blocks were encased in homogenized paraffin (HISTOMIX®) using a carousel-type histological wiring machine «STP 120». Serial frontal slices with a thickness of 4 microns were cut at the distance from -2.40 to -4.36 mm from bregma [1]. The sledge microtome HM 450 (Thermo) with electronic control of the slice thickness was employed to make preparations from each 10-th serial cut (5 per case, 25 per each time point).

For a general histological study, the sections were stained with hematoxylin and eosin according to Nissl. Astrocytes were detected by immunohistochemical reaction to glial fibrillary protein (GFAP), and neurons were

($n=5$), 14 ($n=5$) и 30 ($n=5$) суток после ООСА. Контролем ($n=5$) служили ложнооперированные (без ООСА) животные. Головной мозг фиксировали путем перфузии 4% раствора параформа на 0,1 М фосфатном буфере (рН — 7,4) через восходящую часть дуги аорты. Блоки заключали в гомогенизированный парафин (HISTOMIX®) с помощью автомата для гистологической проводки карусельного типа «STP 120». Серийные фронтальные срезы толщиной 4 мкм резали на уровне (от -2,40 до -4,36 мм Bregma) [1]. Использовали санный микротом HM 450 (Thermo) с электронным контролем толщины среза. Препараты готовили из каждого 10-го серийного среза (5 — на случай, 25 — на срок).

Для обзорного гистологического исследования срезы окрашивали по Нисслю, гематоксилином и эозином. Астроциты выявляли с помощью иммуногистохимической реакции на глиальный фибриллярный белок (GFAP), а нейроны — ассоциированного с микротрубочками белка (MAP-2). Срезы помещали на полилизинные стекла. Применяли моноклональные мышинные антитела к GFAP (клон GA5, разведение 1:400), (Leica Biosystems Newcastle Ltd, Великобритания) и поликлональные кроличьи антитела к MAP-2 (ab32454, разведение 1:400) (abcam, США). Для визуализации GFAP и MAP-2 использовали мультимерный набор Novolink™ (DAB) Polymer Detection System (Leica Biosystems Newcastle Ltd, Великобритания). После реакции с первичными антителами срезы последовательно инкубировали с вторичными антителами, затем хромогеном DAB (3,3'-диаминобензидин), докрашивали гематоксилином, заключали в полистирол.

Препараты фотографировали на микроскопе Leica DM 1000 (камера GXCAM-DM800 Unique Wrap-Around 8MP AUTOFOCUS USB, pixel size 1,4×1,4 μm). Для достижения максимальной контрастности и четкости мелких отростков астроцитов в Photoshop CS проводили коррекцию изображения с помощью фильтра Camera Raw (контрастность, баланс белого, четкость). Морфометрическое исследование астроцитов проводили на масках 8-битовых черно-белых изображений (объектив ×40) с использованием программы ImageJ 1.52. Фрактальный анализ полученных изображений осуществляли с помощью плагина FracLac 2.5 (Box Counting Sampling Methods) [15].

Определяли относительную площадь GFAP- и MAP2-позитивного материала в поле зрения (по 80 полей зрения на каждый срок — с пяти животных), фрактальную размерность (ФР — показатель заполнения пространства фрактальной структурой) и лакуарность (Λ — мера неоднородности заполнения пространства фрактальной структурой) для нейронов и астроцитов. Чем выше лакуарность, тем больше в поле зрения имелось областей без хромогена. Для количественной оценки популяции нейронов ЗФ и поля CA4 через 1, 3, 7, 14 и 30 суток после ООСА подсчитывали численную плотность нормохромных нейронов, содержащих ядрышко (как маркер).

Проверку статистических гипотез проводили с помощью χ^2 , Mann–Whitney *U*-test, Wilcoxon signed-rank test и Kruskal–Wallis test (ANOVA) (StatSoft Statistica 8.0) [20]. В ходе проведения статистического анализа нулевую гипотезу отвергали при $p \leq 0,05$.

identified using microtubule associated protein (MAR-2). The sections were placed on poly-L-lysine glasses. Monoclonal mouse antibodies to GFAP (GA5 clone, 1:400 dilution) (Leica Biosystems Newcastle Ltd, UK) and polyclonal rabbit antibodies to MAP-2 (ab32454, 1:400 dilution) (Abcam, USA) were used. The Novolink™ (DAB) Polymer Detection System (Leica Biosystems Newcastle Ltd, UK) was used to visualize GFAP and MAP-2. After reaction with primary antibodies, the sections were successively incubated with secondary antibodies, then with DAB Chromogen (3,3'-diaminobenzidine), stained with hematoxylin, and encased in polystyrene.

The preparations were photographed with a microscope Leica DM 1000 (camera GXCAM-DM800 Unique Wrap-Around 8MP AUTOFOCUS USB, pixel size 1,4×1,4 μm). For maximal contrast and clarity of small processes of astrocytes, image correction was performed in Photoshop CS using the Camera Raw filter (contrast, white balance, clarity). Morphometric study of astrocytes was done on masks of 8-bit black-and-white images (lens ×40) using the ImageJ 1.52 program. Fractal analysis of the obtained images was carried out using the FracLac 2.5 plugin (Box Counting Sampling Methods) [15].

The relative area of GFAP- and MAP2-positive material in the vision field (80 vision fields for each period, from five animals), fractal dimension (index of space filling with fractal structure) and lacunarity (measure of inhomogeneity of space filling with fractal structure) for neurons and astrocytes were determined. The higher the lacunarity, the more chromogen-free regions were seen per vision field. The numerical density of normochromic neurons containing nucleolus (as a marker) was assessed to quantify the population of DG and CA4 area neurons after 1, 3, 7, 14 and 30 days after OCCA.

Statistical hypotheses were tested using χ^2 , Mann–Whitney *U*-test, Wilcoxon signed-rank test and Kruskal–Wallis test (ANOVA) (StatSoft Statistica 8.0) [20]. During the statistical analysis, the null hypothesis was rejected at $P \leq 0.05$.

Results and Discussion

Normally, the dentate gyrus (DG) is characterized by a very high density of distribution of normochromic neurons (granular cells) (fig. 1, *a*, table 1) and their dendritic processes containing MAP-2 (fig. 1, *b*). In CA4, the density of neurons was significantly less, and their bodies and distances between cells were greater than between granular cells in DG. However, the numerical density of gliocytes and the size of their bodies did not differ (table 1). When stained for MAR-2, the relative area of chromogen in the molecular layer of DG was 42.5 (38.7–44.1)% in the control, and 17.9 (13.4–20.5)% in the polymorphic layer. The relative area of MAR-2 in the molecular layer of CA4 was 38.5 (29.8–46.5)%.

After OCCA, various hyperchromic neurons were detected in DG and CA4 throughout the post-ischemic period (fig. 2, *a*). The maximum content of hyperchromic neurons was observed 3 days after the restoration of blood flow (15.5% in DG, 53.2% in CA4). Non-shrunken neurons prevailed, the proportion of irreversibly altered hyperchromic

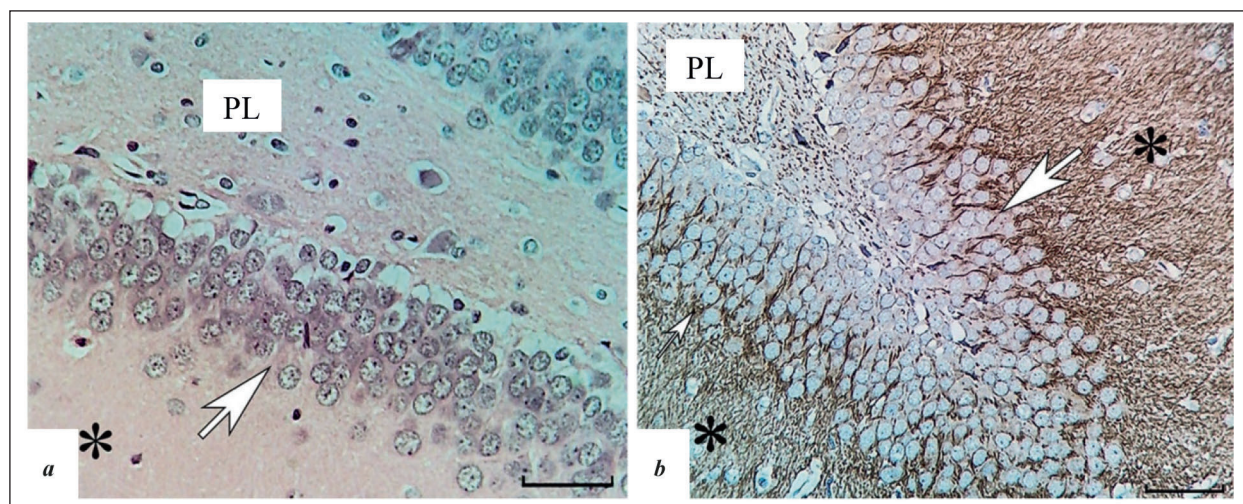


Рис. 1. Зубчатая фасция гиппокампа белых крыс, контроль.

Fig. 1. Dentate gyrus of hippocampus of white rats, control.

Note. *a* — hematoxylin and eosin; *b* — immunohistochemistry, MAP-2. White arrows indicate granular layer; asterisks indicate molecular layer. For fig. 1–3: PL points out the polymorphic layer. Lens $\times 40$; scale 60 microns.

Примечание. *a* — гематоксилин и эозин; *b* — иммуногистохимия, MAP-2. Белые стрелки — гранулярный слой; * — молекулярный слой. Для рис. 1–3: PL — полиморфный слой. Объектив: $\times 40$; шкала — 60 мкм.

Таблица 1. Морфометрическая характеристика нейронов и астроцитов зубчатой фасции и СА4 гиппокампа головного мозга белых крыс в контроле, *Me (QL–QU)*.

Table 1. Morphometric characteristics of neurons and astrocytes of dentate gyrus and CA4 hippocampal field of white rat brain in control group, *Me (QL–QU)*.

Indicators	Area	
	Dentate gyrus	CA4
Total numerical density of neurons, per 1 mm ²	6154 (5550–6408)*	1430 (1256–1495)
Pericaryon area, μm^2	52.8 (48.4–56.5)*	214.3 (178.3–232.8)
Core area, μm^2	40.4 (38.2–41.1)*	116.9 (98.8–133.5)
The distance between the nucleoli of neurons, μm	10.5 (9.9–10.7)*	26.8 (15.3–37.5)
Total numerical density of gliocytes, per 1 mm ² sector	1705.7 (1567.1–1799.8)	1722.2 (1498.5–1812.4)
The body area of an astrocyte, μm^2	39.2 (35.5–40.9)	37.2 (34.3–41.9)
Neuroglial index, units	0.27 (0.26–0.43)*	1.2 (0.8–1.3)

Note. Nissl staining. * — differences in comparison with CA4 are statistically significant at $P < 0.05$ (Wilcoxon criterion for two dependent samples). Me — median; QL — lower quartile; QU — upper quartile.

Примечание. Indicators — показатели; для табл. 1, 2: area — отдел; для табл. 1, 2, 4, 5: dentate gyrus — зубчатая фасция. Total numerical density of neurons, per ... — общая численная плотность нейронов, на ...; pericaryon area — площадь перикариона; core area — площадь ядра; the distance between the nucleoli of neurons — расстояние между ядрышками нейронов; total numerical density of gliocytes, per ... sector — общая численная плотность глиоцитов, на ... сектора; the body area of an astrocyte — площадь тела астроцита; neuroglial index, units — нейроглиальный индекс, от. ед. Окраска по Нисслю. * — различия в сравнении с СА4 статистически значимы при $p < 0,05$ (критерий Вилкоксона для двух зависимых выборок). Me — медиана; Q1 — нижний; Qu — верхний квартили; ЯЦО — ядерно-цитоплазматическое отношение (площадь ядра/площадь цитоплазмы).

Результаты и обсуждение

В норме зубчатая фасция (ЗФ) характеризовалась очень высокой плотностью гранулярных клеток (рис. 1, *a*; табл. 1) и их дендритных отростков, содержащих MAP-2 (рис. 1, *b*). В СА4 численная плотность нейронов была значительно меньше, а их тела и расстояния между клетками больше, чем в ЗФ. При этом общая численная плотность глиоцитов и размеры их тел не различались (табл. 1). При окраске на MAP-2 относительная площадь хромогена в молекулярном слое ЗФ составила в контроле 42,5 (38,7–44,1)%, а в полиморфном слое — 17,9 (13,4–20,5)%. Относительная площадь MAP-2 в

shrunk neurons with homogenized nucleus and cytoplasm in this period was about 2–2.5% (DG) and 3–5% (CA4 area). Thus, the proportion of typical normochromic neurons in comparison with control group was significantly reduced. In the CA4 area, statistically significant differences in the proportion of normochromic neurons persisted after 7, 14, and 30 days (table 2).

In the CA4 area after 1, 3, 7 and 14 days after OCCA there were no statistically significant changes in the total numerical density of neurons (TNDN). Only after 30 days, the TNDN deficit was 5.3% (Mann–Whitney *U*-test, $P < 0.05$). In DG, no significant changes in TNDN were detected during

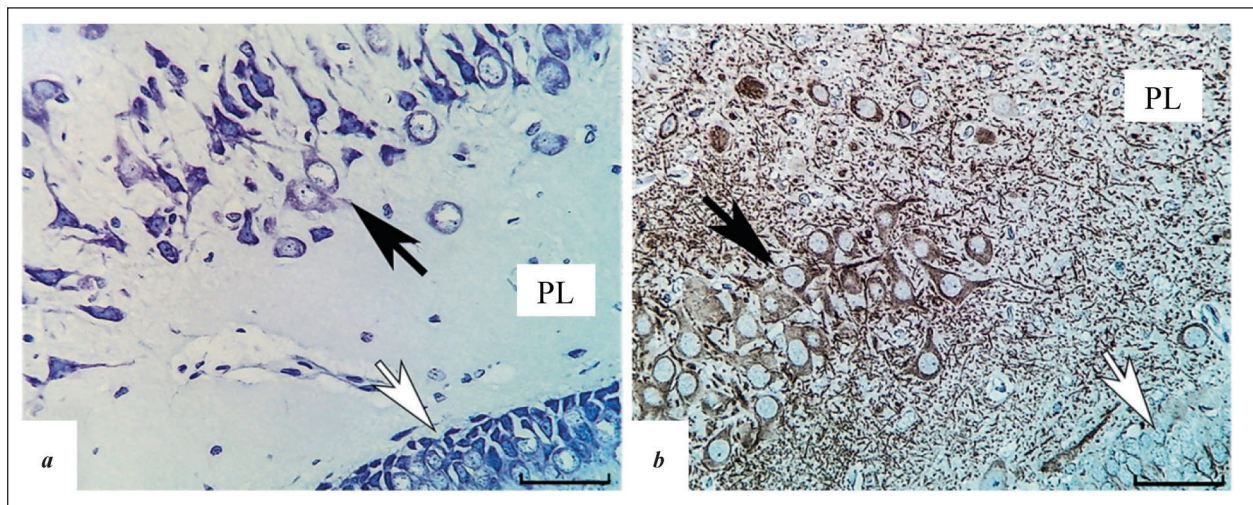


Рис. 2. Поле СА4 и ЗФ гиппокампа белых крыс, 1 суток после ООСА.

Fig. 2. Hippocampal CA4 and DG areas of white rats, 1 day after OCCA.

Note. *a* — normo- and hyperchromic neurons (Nissl staining); *b* — immunohistochemistry (MAP-2). White arrows indicate granular layer, asterisks indicate molecular layer; PL points out the polymorphic layer. Lens $\times 40$, scale 60 microns.

Примечание. *a* — нормо- и гиперхромные нейроны (окраска по Нисслю); *b* — иммуногистохимия (MAP-2). Белые стрелки — гранулярный слой; черные стрелки — нейроны поля СА4. Объектив: $\times 40$, шкала — 60 мкм.

Таблица 2. Содержание нормохромных нейронов в зубчатой фасции и СА4 гиппокампа (на 1 мм² поля зрения) в контроле и после ООСА, Me (QL–QU).

Table 2. Numerical density of normochromic neurons in the dentate gyrus and CA4 of the hippocampus (per 1 mm² of vision field) in the control group and after OCCA, Me (QL–QU).

Groups	Area	
	Dentate gyrus	CA4
Control	6001 (5420–6204)	1409 (1172–1488)
After OCCA, day		
1	4941 (4745–5102)*	886 (805–1009)*
3	4470 (4234–4555)**	659 (554–755)**
7	5485 (5356–5878)	747 (543–897)*
14	5533 (5235–5902)	1005 (897–1230)**
30	5731 (5672–5876)	1155 (754–1432)*

Note. Me — median; QL — lower quartile; QU — upper quartile. * — differences are statistically significant in comparison with the control; # — comparison with the previous period (Mann–Whitney criteria); differences are statistically significant at $P < 0.05$.

Примечание. Groups — группы; control — контроль; after ..., day — после ..., сутки; Me — медиана; QL — нижний; QU — верхний квартили. * — различия статистически значимы в сравнении с контролем; # — сравнение с предыдущим сроком (критерии Манна–Уитни); различия статистически значимы при $p < 0.05$.

молекулярном слое поля СА4 составила 38,5 (29,8–46,5)%.

После ООСА в ЗФ и СА4 на протяжении всего постишемического периода выявляли различные гиперхромные нейроны (рис. 2, *a*). Максимальное их содержание отмечали через 3 суток после восстановления кровотока (ЗФ 15,5%, СА4 53,2%). Преобладали несморщенные нейроны, а содержание необратимо измененных гиперхромных сморщенных нейронов с гомогенизацией ядра и цитоплазмы в этот срок было на уровне 2–2,5% (ЗФ) и 3–5% (поле СА4). Как следствие, численная плотность типичных нормохромных нейронов в сравнении с контролем статистически значимо снижалась. В поле СА4 значимые различия по содержанию нормохромных нейронов сохранялись через 7, 14 и 30 суток (табл. 2).

the entire follow-up period (3.8%, $P > 0.05$). Thus, after a 20-minute OCCA in the studied parts of the hippocampus, the TNDN remained at a level close to the control.

In immunohistochemical light-optical study of DG in the control group and after OCCA a heterogeneous distribution of GFAP-positive material was revealed: the maximum was seen in the polymorphic layer, the minimum was recorded in the granular layer (fig. 3).

In DG, GFAP-positive material was detected mainly in the bodies and processes of fibrous astrocytes (FA) (fig. 3). These astrocytes had a tree-like structure: a small body (diameter 7–13 microns), long (more often in the molecular and granular layers) or short (more often in the polymorphic layer), smooth weakly branched processes with a very high density of chromogen. The fibrous astrocytes

В поле СА4 через 1, 3, 7 и 14 суток после ООСА общая численная плотность нейронов (ОЧПН на 1 мм² поля зрения) статистически значимо не изменялась. Только через 30 суток дефицит ОЧПН составил 5,3% (Mann–Whitney *U*-test, $p < 0,05$). В ЗФ значимых изменений ОЧПН на протяжении всего периода наблюдения выявлено не было (3,8%, $p > 0,05$). Таким образом, после 20-минутной ООСА в изученных отделах ОЧПН оставалась на близком к контролю уровне.

При иммуногистохимическом светооптическом исследовании ЗФ в контроле и после ООСА выявили неоднородное распределение GFAP-позитивного материала: максимально в полиморфном, минимально — в гранулярном слое (рис. 3).

В ЗФ GFAP-позитивный материал выявляли преимущественно в телах и отростках фиброзных астроцитов (ФА) (рис. 3). Эти астроциты имели древовидную организацию: небольшое тело (диаметр 7–13 мкм), длинные (чаще в молекулярном и гранулярном слоях) или короткие (чаще в полиморфном слое), гладкие слабоветвистые отростки с очень высокой плотностью хромогена. ФА занимали непрерывающиеся или слегка перекрывающиеся пространственные области (домены), которые были заполнены толстыми и тонкими ветвями отростков. Наиболее крупные ФА с толстыми отростками выявляли в молекулярном слое ЗФ через 14 и 30 суток после ООСА (рис. 3, *e, f*). ФА в гранулярном и молекулярном слоях имели характерные длинные прямые отростки в поперечном направлении. В полиморфном слое преобладали ФА с короткими отростками без преобладающего направления (рис. 3).

Протоплазматические астроциты (ПА) выявляли преимущественно вокруг полиморфных нейронов и в молекулярном слое поля СА4 (рис. 4). Для этих клеток было характерно относительно крупное тело, толстые короткие первичные отростки с неровными контурами, рыхлое заполнение хромогеном и большое количество очень мелких отростков. Мелкие астроцитарные отростки выглядели как хаотический рисунок с невысокой оптической плотностью хромогена (рис. 4, *a*). ПА, как и ФА были связаны с кровеносными сосудами (рис. 4, *b*).

После ООСА увеличивалось количество реактивно измененных астроцитов — и протоплазматических, и фиброзных. Для этих клеток было характерно: высокая очаговая плотность распределения, гипертрофия отростков (утолщение, удлинение) и усложнение фиброархитектоники (рис. 4, *5*).

В контроле, по данным классического морфометрического анализа, относительная

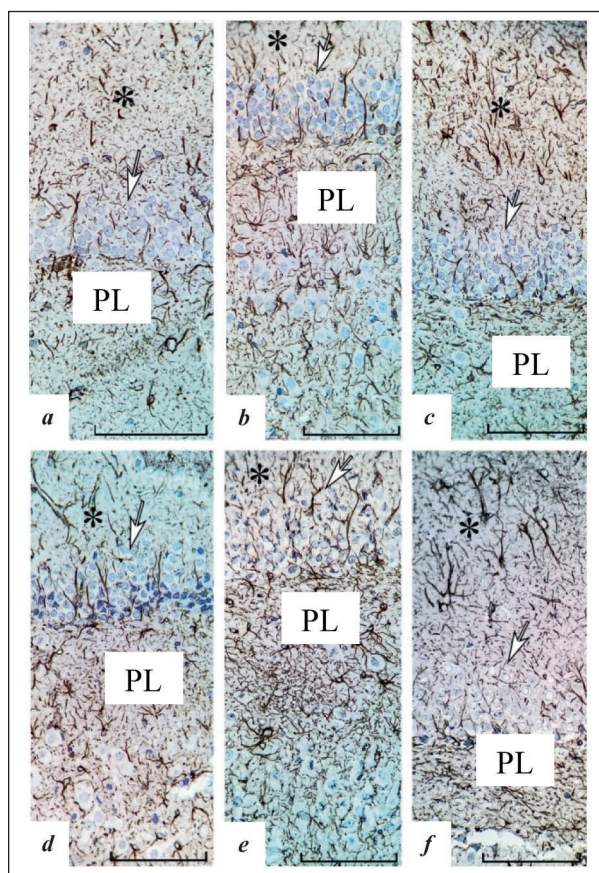


Рис. 3. Фронтальные срезы головного мозга на уровне гиппокампа.

Fig. 3. Frontal sections of brain at the level of hippocampus.

Note. Uneven distribution of chromogen in the layers of the dentate gyrus in the control (*a*), 6 hours (*b*), 1 day (*c*), 3 days (*d*), 14 days (*e*) and 30 days (*f*) after OCSA. White arrows indicate granular layer; asterisks indicate molecular layer. Staining: immunohistochemical reaction to GFAP, hematoxylin post-staining. Lens $\times 40$; scale 100 microns.

Примечание. Неравномерное распределение хромогена в слоях зубчатой фасции в контроле (*a*), через 6 часов (*b*), 1 сутки (*c*), 3 суток (*d*), 14 суток (*e*) и 30 суток (*f*) после ООСА. Белые стрелки — гранулярный слой; * — молекулярный слой. Окраска: иммуногистохимическая реакция на GFAP, докраска гематоксилином. Объектив: $\times 40$; шкала — 100 мкм.

occupied non-overlapping or slightly overlapping spatial regions (domains), which were filled with thick and thin branches of processes. The largest FA with thick processes were detected in the molecular layer of DG 14 and 30 days after OCSA (fig. 3, *e, f*). The fibrous astrocytes in the granular and molecular layers had characteristic long straight processes in the transverse direction. The polymorphic layer was dominated by FA with short processes without a predominant direction (fig. 3).

Protoplasmic astrocytes (PA) were detected mainly around polymorphic neurons and in the molecular layer of the CA4 area (fig. 4). These cells were characterized by a relatively large body, thick short primary processes with irregular contours, loose filling with chromogen and a large number of very small processes. Small astrocytic processes

площадь частиц хромогена (в единице поля зрения) минимальной была в гранулярном, а максимальной — в полиморфном слое ЗФ (табл. 3). Через 1 сутки после ООСА во всех слоях ЗФ выявляли незначительное (на 5–6%), но статистически значимое увеличение этого показателя. Подобные реактивные изменения длительно сохранялись. Максимальное увеличение площади GFAP (на 10,7% в сравнении с контролем) отмечали через 14 суток после ООСА в полиморфном слое (табл. 3).

Для дополнительной количественной характеристики астроцитов, включающей оценку не только площади, но и формы, распределения их отростков в пространстве использовали фрактальный анализ молекулярного и полиморфного слоев ЗФ. Согласно его результатам, в контроле показатели заполнения пространства фрактальными структурами (иммунореактивные к GFAP отростки и тела астроцитов) в этих слоях статистически значимо различались. В полиморфном слое была больше фрактальная размерность (ФР) (табл. 4) и меньше — лакуарность (табл. 5). Это свидетельствовало о большем заполнении пространства полиморфного слоя отростками астроцитов.

В динамике постишемического периода выявили статистически значимые изменения обеих переменных, характеризующих пространственное распределение GFAP-позитивного материала ЗФ (табл. 4, 5).

Через 1 сутки после ООСА, в сравнении с контролем, в молекулярном и полиморфном слоях ЗФ увеличивалась ФР, а лакуарность — уменьшалась (табл. 4, 5). Через 6 часов, 3, 7, 14

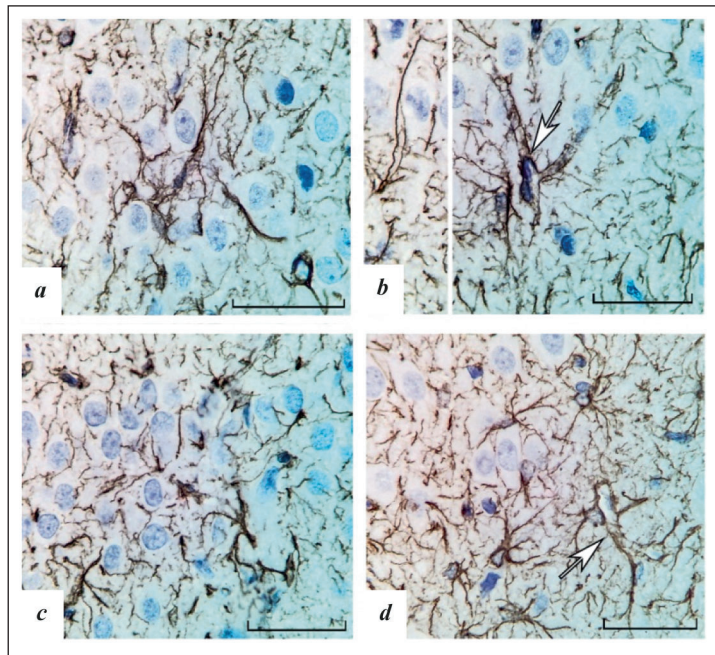


Рис. 4. Протоплазматические астроциты CA4 через 6 часов после ООСА.

Fig. 4. Protoplasmic CA4 astrocytes 6 hours after OCCA.

Note. *a* — large number of small processes on the main stems; *b* — structural connection of astrocyte processes with microvessels; *c, d* — increase in the density of astrocyte distribution between neurons and their domains (*d*). White arrows indicate microvessels. Staining: immunohistochemical reaction to GFAP, hematoxylin post-staining. Lens $\times 100$; scale 25 microns.

Примечание. *a* — большое количество мелких отростков на основных стволах; *b* — структурная связь отростков астроцитов с микрососудом; *c, d* — увеличение плотности распределения астроцитов между нейронами и их домены (*d*). Белые стрелки — микрососуды. Окраска: иммуногистохимическая реакция на GFAP, докраска гематоксилином. Объектив: $\times 100$; шкала — 25 мкм.

looked like a chaotic pattern with a low optical density of chromogen (fig. 4, *a*). Protoplasmic astrocytes as well as FA were associated with blood vessels (fig. 4, *b*).

After OCCA, the number of reactive astrocytes, both protoplasmic and fibrous, increased. These

Таблица 3. Относительная площадь (%) частиц хромогена при иммуногистохимическом выявлении (GFAP) элементов глияльной сети зубчатой фасции у животных контрольной и основной группы, Me (Q1–Q4).
Table 3. Relative area (%) of chromogen particles in immunohistochemical detection (GFAP) of glial network elements of dentate gyrus in animals of the control and main groups, Me (Q1–Q4).

Group	Layers dimensions			
	All (total)	Molecular	Granular	Polymorphic
Control	13.2 (10.8–14.2)	10.9 (8.9–13.3)	9.8 (8.9–12.1)	15.8 (13.4–17.3) [#]
After OCCA				
6 hours	13.4 (12.8–15.5)	9.1 (8.4–15.1)	11.3 (10.7–14.2)	15.6 (14.1–18.7) [#]
1	17.8 (16.5–19.9) ^{*,#}	17.5 (15.9–20.3) ^{*,#}	16.7 (13.8–18.7) ^{*,#}	20.4 (18.8–23.2) [*]
3	14.9 (10.5–17.8)	12.0 (10.1–14.6) [#]	15.2 (13.6–17.9) [*]	16.0 (13.7–19.2) [#]
7	14.6 (13.4–17.5)	10.6 (9.1–13.5)	10.3 (9.7–13.4) [#]	20.2 (16.8–23.3) ^{*,###}
14	21.3 (19.5–25.3) ^{*,#}	16.6 (15.1–19.9) ^{*,#}	16.7 (14.8–20.2) ^{*,#}	26.3 (22.8–28.5) ^{*,#}
30 days	17.3 (14.8–20.5) [*]	16.3 (14.2–18.5) [*]	10.5 (9.1–15.5) ^{###}	21.7 (18.6–24.5) ^{*,###}

Note. * — differences are statistically significant in comparison with the control; [#] — in comparison with the previous period (Mann–Whitney *U*-test); ^{###} — in comparison with the molecular layer (Wilcoxon signed-rank test) at $P < 0.05$.

Примечание. Для табл. 3–5: group — группа; control — контроль; hours — часы; days — дни; layers — слои; after — после; molecular — молекулярный; polymorphic — полиморфный; dimensions — измерения; all (total) — все (суммарно); granular — гранулярный. * — различия статистически значимы в сравнении с контролем; [#] — в сравнении с предыдущим сроком (Mann–Whitney *U*-test); ^{###} — в сравнении с молекулярным слоем (Wilcoxon signed-rank test) при $p < 0.05$.

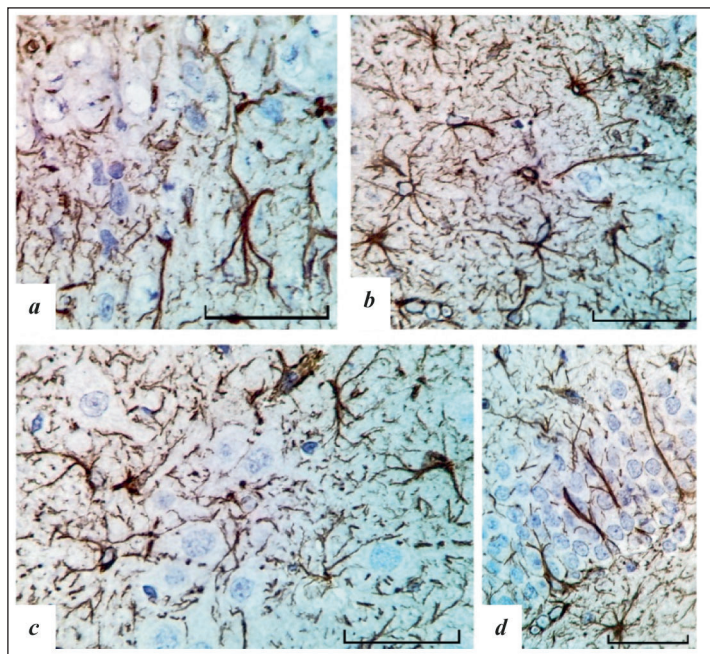


Рис. 5. Фиброзные астроциты зубчатой фассии и СА4 через 1 сутки после ООСА.

Fig. 5. Fibrous astrocytes of dentate gyrus and CA4 1 day after OCCA.

Note. *a* — hypertrophy of astrocyte processes in the molecular layer of dentate gyrus; *b* — increase in the density of astrocyte distribution in the polymorphic layer; *c* — increase in the density of astrocyte distribution within the cell layer of CA4; *d* — hypertrophy of astrocyte processes in the granular layer of dentate gyrus. Staining: immunohistochemical reaction to GFAP, hematoxylin post-staining. Lens $\times 100$; scale 25 microns.

Примечание. *a* — гипертрофия отростков астроцитов в молекулярном слое зубчатой фассии; *b* — увеличение плотности распределения астроцитов в полиморфном слое; *c* — увеличение плотности распределения астроцитов внутри клеточного слоя СА4; *d* — гипертрофия отростков астроцитов в гранулярном слое зубчатой фассии. Окраска: иммуногистохимическая реакция на GFAP, докраска гематоксилином. Объектив: $\times 100$; шкала — 25 мкм.

и 30 суток отмечали гетерохронные и гетероморфные изменения ФР и лакуарности в изученных слоях. Кроме того, через 6 часов, 3, 7 и 14 суток в полиморфном слое ФР была выше, а лакуарность ниже, чем в молекулярном слое. Это, вероятно, свидетельствовало о

cells were characterized by high focal density of distribution, hypertrophy of processes (thickening, elongation) and complex fibroarchitecture (fig. 4, 5).

In the control group, according to the classical morphometric analysis, the relative area of chromogen particles (per unit of vision field) was minimal in the granular, and maximal in the polymorphic layer of the DG (table 3). A slight (5–6%), but statistically significant increase in this indicator was found 1 day after OCCA in all layers of DG. Such reactive changes persisted for a long time. The maximum increase in GFAP area (by 10.7% in comparison with the control) was observed 14 days after OCCA in the polymorphic layer (table 3).

For additional qualitative characterization of astrocytes, including their area, shape and spatial distribution of their processes, we used fractal analysis of the molecular and polymorphic layers of DG. According to its results, the control group demonstrated significant differences in the indices of space filling by fractal structures (immunoreactive to GFAP processes and astrocyte bodies) in these layers. The fractal dimension (FD) was more (table 4) and lacunarity was less (table 5) in the polymorphic layer. Data demonstrate an increased filling of the polymorphic layer space by the processes of astrocytes.

During the post-ischemic period, statistically significant changes in both variables characterizing the spatial distribution of GFAP-positive material of the DG were revealed (table 4, 5).

One day after OCCA, FR increased and lacunarity decreased in the molecular and polymorphic layers of DG in comparison with the control (tables 4, 5). After 6 hours, 3, 7, 14 and 30 days, heterochronous and heteromorphous changes in FD and lacunarity were observed in the studied layers. In addition, after

Таблица 4. Фрактальная размерность (ФР) глиальной (GFAP) сети различных слоев зубчатой фассии в контроле и после ООСА, *Me (QI–QU)*.

Table 4. Fractal dimension (FD) of the glial (GFAP) network of the various dentate gyrus layers in the control and after OCCA, *Me (QI–QU)*.

Group	Layers of the dentate gyrus	
	Molecular	Polymorphic
Control	1.56 (1.47–1.62)	1.67 (1.59–1.72) ^{##}
After OCCA		
6 hours	1.50 (1.45–1.60)	1.80 (1.67–1.85) ^{*,##}
1	1.77 (1.68–1.83) ^{*,#}	1.79 (1.69–1.84) [*]
3	1.55 (1.43–1.61) [#]	1.62 (1.49–1.68) ^{*,##}
7	1.57 (1.51–1.66)	1.73 (1.60–1.79) ^{*,##}
14	1.67 (1.58–1.73) [*]	1.82 (1.66–1.89) ^{*,##}
30 days	1.74 (1.62–1.81) ^{*,#}	1.72 (1.65–1.78) [#]

Note. * — differences are statistically significant in comparison with control; # — previous period (Mann–Whitney *U*-test), ## — molecular layer (Wilcoxon signed-rank test) at $P < 0.05$.

Примечание. * — различия статистически значимы в сравнении с контролем; # — предыдущим сроком (Mann–Whitney *U*-test); ## — молекулярным слоем (Wilcoxon signed-rank test) при $p < 0.05$.

Таблица 5. Лакуарность (L) глиальной (GFAP) сети различных слоев зубчатой фасции в контроле и после ООСА, Me (QI-QU).**Table 5. Lacunarity (L) of the glial (GFAP) network of the various layers of the dentate gyrus in the control and after OCCA, Me (QL-QU).**

Group	Layers of the dentate gyrus	
	Molecular	Polymorphic
Control	0.55 (0.49–0.57)	0.46 (0.41–0.50) ^{##}
After OCCA		
6 hours	0.63 (0.55–0.68) [*]	0.39 (0.35–0.47) ^{*,##}
1	0.39 (0.36–0.47) ^{*,#}	0.35 (0.32–0.42) [*]
3	0.66 (0.60–0.71) ^{*,#}	0.56 (0.50–0.62) ^{*,##}
7	0.76 (0.68–0.79) ^{*,#}	0.35 (0.30–0.48) ^{*,##}
14	0.59 (0.50–0.62) [#]	0.32 (0.29–0.38) ^{*,##}
30 days	0.36 (0.33–0.46) ^{*,#}	0.34 (0.31–0.42) [*]

Note. * — differences are statistically significant in comparison with control; # — previous period (Mann–Whitney *U*-test), ## — molecular layer (Wilcoxon signed-rank test) at $P < 0.05$.

Примечание. * — различия статистически значимы в сравнении с контролем; # — предыдущим сроком (Mann–Whitney *U*-test); ## — молекулярным слоем (Wilcoxon signed-rank test) при $p < 0,05$.

неравномерной реактивной реорганизации астроцитарных отростков в ответ на ишемию и реперфузию — появлении зон с более высокой плотностью и плотным равномерным заполнением пространства за счет разветвления тонких периферических отростков.

Следовательно, фрактальный анализ подтвердил то, что после ООСА в ЗФ происходила гипертрофическая неравномерная пространственная реорганизация реактивных астроцитов (очаговый астроглиоз).

Таким образом, в настоящей работе, с помощью классических методов морфометрии (определение относительной площади GFAP-позитивного материала) и фрактального анализа провели сравнительное исследование астроцитов ЗФ и поля СА4 в контроле и после 20-минутной ООСА. Подобный подход использовался ранее для решения аналогичных задач на других экспериментальных моделях ишемии [7, 11, 12].

Установили, что после ООСА активировались процессы пролиферации и гипертрофии астроцитов. Выявили количественную гетерогенность и гетерохронность изменений пространственной организации астроцитарных отростков в молекулярном и полиморфном слоях ЗФ. Более лабильными и реактивными были мелкие отростки астроцитов. В отдаленном периоде (14 и 30 суток) после ООСА сохранялась повышенная плотность отростков фиброзных астроцитов и общего содержания GFAP-позитивного материала. Максимальные значения характеристик выявили в полиморфном слое. В этот период мера структурной сложности глиальных сетей была существенно выше, а лакуарность ниже, чем в контроле и через 3 и 7 суток постишемического периода. Однако, в нашем исследовании, при отсутствии выраженных очагов некроза и небольшом дефиците нейронов, увеличение количества и площади реактивных фиброзных астроцитов

6 hours, 3, 7 and 14 days, FD was higher and lacunarity was lower in the polymorphic layer than in the molecular layer. This probably indicated an erratic reactive reorganization of astrocytic processes in response to ischemia and reperfusion, i.e. appearance of zones with higher density and dense uniform filling of space due to the branching of thin peripheral processes.

Consequently, fractal analysis confirmed that hypertrophic erratic spatial reorganization of reactive astrocytes (focal astrogliosis) occurred in the DG after OCCA.

Thus, in the present work, using the classical morphometry methods (calculation of the relative area of GFAP-positive material) and fractal analysis, a comparative study of DG and CA4 astrocytes in the control group and after 20-minute OCCA was done. A similar approach was used earlier to solve similar problems in other experimental models of ischemia [7, 11, 12].

Mechanisms of astrocyte hypertrophy were activated after the OCCA. The quantitative heterogeneity and heterochronicity of changes in the spatial organization of astrocytic processes in the molecular and polymorphic layers of DG were revealed. Small processes of astrocytes were more labile and reactive. In the long-term period (14 and 30 days) after OCCA, the increased density of fibrous astrocyte processes and the total content of GFAP-positive material persisted. The maximal values of the mentioned characteristics were revealed in the polymorphous layer. During this period, the structural complexity of glial networks was significantly higher, and lacunarity was lower than in the controls and after 3 and 7 days of the post-ischemic period. However, in our study, with a small neuronal deficit and without severe necrotic foci, the increased number and area of reactive fibrous astrocytes should be considered as evidence of the activation of natural protective functions of the astroglia, aimed at preserving and restoring damaged neurons. Some literature evidence also suggests a protective and restorative role

следует рассматривать как свидетельство активации естественных защитных функций астроглии, направленных на сохранение и восстановление поврежденных нейронов. Некоторые литературные данные также свидетельствуют о защитной и восстановительной роли реактивных астроцитов [7, 11, 12, 21–23]. Все это свидетельствует о перспективности изучения астроглиоза и особенностей нейроглиальных отношений в разных отделах головного мозга после острой ишемии, травмы и при нейродегенеративных заболеваниях [24, 25]

Полученные результаты могут быть использованы для понимания структурных основ естественной нейропротекции за счет активации механизмов реактивного астроглиоза в постишемическом периоде.

Заключение

После 20-минутной ООСА в зубчатой фации и поле CA4 белых крыс увеличивалась плотность GFAP-позитивного материала, усложнялась реорганизация фиброархитектоники за счет разветвления отростков астроцитов. Это происходило на фоне незначительного уменьшения общей численной плотности нейронов. Практическое значение данного исследования заключается в том, что оно подтверждает наличие реактивного астроглиоза при малых повреждениях, целенаправленная регуляция которого позволит, вероятно, влиять на процессы восстановления нейронов после острой ишемии.

Благодарность. Данная работа выполнена при поддержке Фонда содействия инновациям по программе «УМНИК» №14 от 15.12.2017г. и внутреннего гранта ФГБОУ ВО Омского государственного медицинского университета №574 от 24.11.2017 г.

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

Семью авторами лично и в равном количестве применен комплексный методологический подход, включающий экспериментальный, анатомический, гистологический, морфометриче-

ский и информационно-математический методы, а также методы наблюдения, описания и анализа.

Работа выполнена на базе ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет», одобрено этическим комитетом университета (протокол №112 от 26 сентября 2019 года).

Conclusion

After 20-minute OCCA in the dentate gyrus and CA4 area of white rats, the density of GFAP-positive material increased, complex reorganization of fibroarchitecture occurred due to the branching of astrocyte processes. This was associated with a slight decrease in the total numerical density of neurons. This study confirms the presence of reactive astrogliosis in small lesions. Targeted regulation of astrogliosis will probably affect the neuronal recovery after acute ischemia.

Acknowledgment. This work was supported by the Foundation for Assistance to Innovations within the framework of «UMNIK» program No.14 dated 15.12.2017 and the internal grant of the Omsk State Medical University No. 574 dated 24.11.2017.

Conflict of Interest. The authors declare no conflict of interest. The work was done at Omsk State Medical University and approved by the Ethics Committee of the University (Protocol No.112 of September 26, 2019).

The authors declare no obvious or potential conflicts of interest related to the publication of this article. All the authors participated in the study and used an integrated methodological approach, including experimental, anatomical, histological, morphometric and information-mathematical methods, as well as methods of observation, description and analysis.

ский и информационно-математический методы, а также методы наблюдения, описания и анализа.

Работа выполнена на базе ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет», одобрено этическим комитетом университета (протокол №112 от 26 сентября 2019 года).

Литература

1. Paxinos G., Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. 5th ed. San Diego: Elsevier Academic Press; 2005.
2. Senzai Y. Function of local circuits in the hippocampal dentate gyrus-CA3 system. *Neurosci Res.* 2019 Mar; 140: 43–52. PMID: 30408501 DOI: 10.1016/j.neures.2018.11.003.
3. Fares J., Bou Diab Z., Nabha S., Fares Y. Neurogenesis in the adult hippocampus: history, regulation, and prospective roles. *Int J Neurosci.* 2019 Jun; 129 (6): 598–611. PMID: 30433866 DOI: 10.1080/00207454.2018.1545771.
4. Abbott L.C., Nigussie F. Adult neurogenesis in the mammalian dentate gyrus. *Anat Histol Embryol.* 2019 Sep 30. PMID: 31568602 DOI: 10.1111/ahel.12496.
5. Miller S.M., Sahay A. Functions of adult-born neurons in hippocampal memory interference and indexing. *Nat Neurosci.* 2019 Oct; 22 (10): 1565–1575. PMID: 31477897 DOI: 10.1038/s41593-019-0484-2.

References

1. Paxinos G., Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. 5th ed. San Diego: Elsevier Academic Press; 2005.
2. Senzai Y. Function of local circuits in the hippocampal dentate gyrus-CA3 system. *Neurosci Res.* 2019 Mar; 140: 43–52. PMID: 30408501 DOI: 10.1016/j.neures.2018.11.003.
3. Fares J., Bou Diab Z., Nabha S., Fares Y. Neurogenesis in the adult hippocampus: history, regulation, and prospective roles. *Int J Neurosci.* 2019 Jun; 129 (6): 598–611. PMID: 30433866 DOI: 10.1080/00207454.2018.1545771.
4. Abbott L.C., Nigussie F. Adult neurogenesis in the mammalian dentate gyrus. *Anat Histol Embryol.* 2019 Sep 30. PMID: 31568602 DOI: 10.1111/ahel.12496.
5. Miller S.M., Sahay A. Functions of adult-born neurons in hippocampal memory interference and indexing. *Nat Neurosci.* 2019 Oct; 22 (10): 1565–1575. PMID: 31477897 DOI: 10.1038/s41593-019-0484-2.

6. Alkadhi K.A. Cellular and molecular differences between area ca1 and the dentate gyrus of the hippocampus. *Mol Neurobiol.* 2019 Sep; 56 (9): 6566–6580. PMID: 30874972 DOI: 10.1007/s12035-019-1541-2.
7. Becerra-Calixto A., Cardona-Gómez G.P. The Role of Astrocytes in Neuroprotection after Brain Stroke: Potential in Cell Therapy. *Front Mol Neurosci.* 2017 Apr 3; 10 (159): 88. PMID: 28420961. DOI: 10.3389/fnmol.2017.00088.
8. Mohn T.C., Koob A.O. Adult astrogenesis and the etiology of cortical neurodegeneration. *J. Exp. Neurosci.* 2015; 9: 25–34. PMID: 26568684. DOI: 10.4137/JEN.S25520.
9. Rose C. R., Felix L., Zeug A., Dietrich D., Reiner A., Henneberger C. Astroglial glutamate signaling and uptake in the hippocampus. *Front. Mol. Neurosci.* 2018; 10 (451): 1–20. PMID: 29386994. DOI: 10.3389/fnmol.2017.00451
10. Plata A., Lebedeva A., Denisov P., Nosova O., Postnikova T.Y., Pimashkin A., Brazhe A., Zaitsev A.V., Rusakov D.A., Semyanov A. Astrocytic Atrophy Following Status Epilepticus Parallels Reduced Ca²⁺ Activity and Impaired Synaptic Plasticity in the Rat Hippocampus. *Front Mol Neurosci.* 2018 Jun 26; 11: 215. PMID: 29997475. DOI: 10.3389/fnmol.2018.00215
11. Pirici D., Mogoantă L., Mărgăritescu O., Pirici I., Tudorică V., Coconu M. Fractal analysis of astrocytes in stroke and dementia. *Rom. J. Morphol. Embryol.* 2009; 50 (3): 381–390. PMID: 19690763.
12. Ostergaard P.J., Jensen M.B. Histological quantification of astrocytosis after cerebral infarction: A systematic review. *Int. J. Neurosci.* 2013; 123 (7): 439–443. PMID: 23311713. DOI: 10.3109/00207454.2013.765421.
13. Степанов А.С., Акулинин В.А., Мызык А.В., Степанов С.С., Авдеев Д.Б. Нейро-глио-сосудистые комплексы головного мозга после острой ишемии. *Общая реаниматология.* 2017; 13 (6): 6–17. DOI: 10.15360/1813-9779-2017-6-6-17
14. Степанов С.С., Акулинин В.А., Авдеев Д.Б., Степанов А.С., Горбунова А.В. Реорганизация астроцитов неокортекса белых крыс после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова.* 2019. Т. 105. № 5. С. 578–590. DOI: 10.1134/S086981391905011X
15. Karperien A., Ahammer H., Jelinek H.F. Quantitating the subtleties of microglial morphology with fractal analysis. *Front. Cell. Neurosci.* 2013; 7 (3): 1–18. PMID: 23386810. DOI: 10.3389/fncel.2013.00003.
16. Исаева В.В., Пушчина Е.В., Каретин Ю.А. Изменения морфометрических показателей и фрактальной размерности нейронов спинного мозга в онтогенезе симы *Oncorhynchus masou*. *Биология моря.* 2006; 32 (2): 125–133.
17. Lopez M.S., Vemuganti R. Modeling transient focal ischemic stroke in rodents by intraluminal filament method of middle cerebral artery occlusion. *Methods Mol Biol.* 2018; 1717: 101–113. PMID: 29468587 DOI: 10.1007/978-1-4939-7526-6_9.
18. Вавилова В.А., Гушчин Я.А. Моделирование глобальной церебральной ишемии у монгольских песчанок. *Лабораторные животные для научных исследований.* 2019; 2. DOI: 10.29296/2618723X-2019-02-03
19. Gennaro M., Mattiello A., Pizzorusso T. Rodent models of developmental ischemic stroke for translational research: strengths and weaknesses. *Neural. Plast.* 2019 Apr 4; 2019: 5089321. PMID: 31093271 DOI: 10.1155/2019/5089321.
20. Боровиков В. *Statistica. Искусство анализа данных на компьютере.* СПб: Питер; 2003: 688. [In Russ.]
21. Escartin C., Guillemaud O., Carrillo-de Sauvage M.A. Questions and (some) answers on reactive astrocytes. *Glia.* 2019 Dec; 67 (12): 2221–2247. PMID: 31429127 DOI: 10.1002/glia.23687.
22. Verkhatsky A., Ho M.S., Vardjan N., Zorec R., Parpura V. General pathophysiology of astroglia. *Adv Exp Med Biol.* 2019; 1175: 149–179. PMID: 31583588 DOI: 10.1007/978-981-13-9913-8_7.
23. Zhou B., Zuo Y.X., Jiang R.T. Astrocyte morphology: Diversity, plasticity, and role in neurological diseases. *CNS Neurosci Ther.* 2019; 25 (6): 665–673. PMID: 30929313 DOI: 10.1111/cns.13123.
24. Zuidema J.M., Gilbert R.J., Gottipati M.K. Biomaterial approaches to modulate reactive astroglial response. *Cells Tissues Organs.* 2018; 205 (5–6): 372–395. PMID: 30517922 DOI: 10.1159/000494667.
25. Zhou Y.D. Glial Regulation of Energy Metabolism. *Adv Exp Med Biol.* 2018; 1090: 105–121. DOI: 10.1007/978-981-13-1286-1_6.
6. Alkadhi K.A. Cellular and molecular differences between area ca1 and the dentate gyrus of the hippocampus. *Mol Neurobiol.* 2019 Sep; 56 (9): 6566–6580. PMID: 30874972 DOI: 10.1007/s12035-019-1541-2.
7. Becerra-Calixto A., Cardona-Gómez G.P. The Role of Astrocytes in Neuroprotection after Brain Stroke: Potential in Cell Therapy. *Front Mol Neurosci.* 2017 Apr 3; 10 (159): 88. PMID: 28420961. DOI: 10.3389/fnmol.2017.00088.
8. Mohn T.C., Koob A.O. Adult astrogenesis and the etiology of cortical neurodegeneration. *J. Exp. Neurosci.* 2015; 9: 25–34. PMID: 26568684. DOI: 10.4137/JEN.S25520.
9. Rose C. R., Felix L., Zeug A., Dietrich D., Reiner A., Henneberger C. Astroglial glutamate signaling and uptake in the hippocampus. *Front. Mol. Neurosci.* 2018; 10 (451): 1–20. PMID: 29386994. DOI: 10.3389/fnmol.2017.00451
10. Plata A., Lebedeva A., Denisov P., Nosova O., Postnikova T.Y., Pimashkin A., Brazhe A., Zaitsev A.V., Rusakov D.A., Semyanov A. Astrocytic Atrophy Following Status Epilepticus Parallels Reduced Ca²⁺ Activity and Impaired Synaptic Plasticity in the Rat Hippocampus. *Front Mol Neurosci.* 2018 Jun 26; 11: 215. PMID: 29997475. DOI: 10.3389/fnmol.2018.00215
11. Pirici D., Mogoantă L., Mărgăritescu O., Pirici I., Tudorică V., Coconu M. Fractal analysis of astrocytes in stroke and dementia. *Rom. J. Morphol. Embryol.* 2009; 50 (3): 381–390. PMID: 19690763.
12. Ostergaard P.J., Jensen M.B. Histological quantification of astrocytosis after cerebral infarction: A systematic review. *Int. J. Neurosci.* 2013; 123 (7): 439–443. PMID: 23311713. DOI: 10.3109/00207454.2013.765421.
13. Stepanov A.S., Akulinin V.A., Mysik A.V., Stepanov S.S., Avdeev D.B. Neuro-Glio-Vascular Complexes of the Brain After Acute Ischemia. *Obshchaya Reanimatologiya=General Reanimatology.* 2017; 13 (6): 6–17. [In Russ.] DOI: 10.15360/1813-9779-2017-6-6-17
14. Stepanov S.S., Akulinin V.A., Avdeev D.B., Stepanov A.S., Gorbunova A.V. Reorganization of astrocyte neocortex of white rats after a 20-minute occlusion of the common carotid arteries. *Rossiiskij fiziologicheskij zhurnal im. I.M. Sechenova.* 2019; 105 (5): 578–590. [In Russ.] DOI: 10.1134/S086981391905011X
15. Karperien A., Ahammer H., Jelinek H.F. Quantitating the subtleties of microglial morphology with fractal analysis. *Front. Cell. Neurosci.* 2013; 7 (3): 1–18. PMID: 23386810. DOI: 10.3389/fncel.2013.00003.
16. Isaeva V.V., Pushchina E.V., Karetin Yu.A. Changes in morphometric parameters and fractal dimension of spinal cord neurons in the ontogenesis of *Sim Oncorhynchus masou*. *Biologiya morya.* 2006; 32 (2): 125–133. [In Russ.]
17. Lopez M.S., Vemuganti R. Modeling transient focal ischemic stroke in rodents by intraluminal filament method of middle cerebral artery occlusion. *Methods Mol Biol.* 2018; 1717: 101–113. PMID: 29468587 DOI: 10.1007/978-1-4939-7526-6_9.
18. Vavilova V.A., Gushchin Ya.A. Modeling global cerebral ischemia in Mongolian gerbils. *Laboratornye zhivotnye dlya nauchnykh issledovaniy.* 2019; 2. [In Russ.] DOI: 10.29296/2618723X-2019-02-03
19. Gennaro M., Mattiello A., Pizzorusso T. Rodent models of developmental ischemic stroke for translational research: strengths and weaknesses. *Neural. Plast.* 2019 Apr 4; 2019: 5089321. PMID: 31093271 DOI: 10.1155/2019/5089321.
20. Borovikov V. *Statistica. The art of analyzing data on a computer.* St. Petersburg: Peter; 2003: 688. [In Russ.]
21. Escartin C., Guillemaud O., Carrillo-de Sauvage M.A. Questions and (some) answers on reactive astrocytes. *Glia.* 2019 Dec; 67 (12): 2221–2247. PMID: 31429127 DOI: 10.1002/glia.23687.
22. Verkhatsky A., Ho M.S., Vardjan N., Zorec R., Parpura V. General pathophysiology of astroglia. *Adv Exp Med Biol.* 2019; 1175: 149–179. PMID: 31583588 DOI: 10.1007/978-981-13-9913-8_7.
23. Zhou B., Zuo Y.X., Jiang R.T. Astrocyte morphology: Diversity, plasticity, and role in neurological diseases. *CNS Neurosci Ther.* 2019; 25 (6): 665–673. PMID: 30929313 DOI: 10.1111/cns.13123.
24. Zuidema J.M., Gilbert R.J., Gottipati M.K. Biomaterial approaches to modulate reactive astroglial response. *Cells Tissues Organs.* 2018; 205 (5–6): 372–395. PMID: 30517922 DOI: 10.1159/000494667.
25. Zhou Y.D. Glial Regulation of Energy Metabolism. *Adv Exp Med Biol.* 2018; 1090: 105–121. DOI: 10.1007/978-981-13-1286-1_6.

Поступила 04.06.19

Received 04.06.19

Эпикардальная трансплантация пластов из мезенхимальных стромальных клеток жировой клетчатки способствует активации эпикарда и стимулирует ангиогенез при инфаркте миокарда (экспериментальное исследование)

К. В. Дергилев¹, З. И. Цоколаева¹, И. Б. Белоглазова¹, А. В. Комова¹,
С. В. Павлова^{2,3,4}, Д. О. Трактеев⁵, Е. В. Парфенова^{1,6}

¹ Институт экспериментальной кардиологии Национального медицинского исследовательского центра кардиологии Минздрава России, Россия, г. Москва,

² Институт цитологии и генетики Федерального исследовательского центра СО РАН, Россия, 630090, г. Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева, д. 10

³ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Россия, 630000, г. Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева, д. 8

⁴ Новосибирский НИИ патологии кровообращения им. академика Е. Н. Мешалкина Минздрава России, Россия, 630055, г. Новосибирск, ул. Речкуновская, д. 15, к. 1

⁵ Центр регенеративной медицины, Медицинское отделение, Медицинский колледж, Университет Флориды, США, Флорида 32610, Гейнсвилл, M421, 1600 SW Арчер рд.

⁶ Факультет Фундаментальной медицины, Московский Государственный университет им. М. В. Ломоносова, Россия, 119192, г. Москва, Ломоносовский пр-т, д. 31-5

Epicardial Transplantation of Adipose Mesenchymal Stromal Cell Sheets Promotes Epicardial Activation and Stimulates Angiogenesis in Myocardial Infarction (Experimental Study)

Konstantin V. Dergilev¹, Zoya I. Tsokolaeva¹, Irina B. Beloglazova¹, Anastasia V. Komova¹,
Sofia V. Pavlova^{2,3,4}, Dmitry O. Traktuev⁵, Yelena V. Parfyonova^{1,6}

¹ Experimental Cardiology Institute, National Medical Research Center for Cardiology, Ministry of Health of Russia, 15a Cherepkovskaya 3rd Str., 121552 Moscow, Russia

² Institute of Cytology and Genetics, Federal Research Center, Siberian Branch of RAS 10 Academic Lavrentiev Pr., 630090 Novosibirsk, Russia

³ Chemical Biology and Fundamental Medicine Institute, Siberian Branch of RAS 8 Academic Lavrentiev Pr., 630090 Novosibirsk, Russia

⁴ E. N. Meshalkin Novosibirsk Research Institute of Circulation Pathology, Ministry of Health of Russia 15, 1 Rechkunovskaya Str., 630055 Novosibirsk, Russia

⁵ Center for Regenerative Medicine, Department of Medicine, College of Medicine, University of Florida, 1600 SW Archer Rd, M421 Gainesville, FL 32610 USA

⁶ Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University, 31-5 Lomonosovsky Avenue, Moscow 119192, Russia

Цель исследования: оценить влияние трансплантации тканеинженерных конструкций (ТИК) на основе пластов мезенхимальных стромальных клеток (МСК) при инфаркте миокарда на активацию эпикардального пула клеток и васкуляризацию зоны повреждения.

Материалы и методы. МСК получили из образцов подкожной жировой клетчатки крыс линии Wistar и мышей линии C57Bl/6. ТИК получили путем культивирования пластов клеток на чашках с термочувствительным покрытием (Nunc Dishes with UpCell Surface). Трансплантацию ТИК проводили после моделирования инфаркта миокарда у крысы путем перевязки передней нисходящей коронарной артерии. Оценка состояния клеток трансплантата и зоны повреждения проводили с использованием иммунофлуоресцентного окрашивания криосрезов миокарда. Для оценки влияния продуктов секреции МСК на миграционную активность клеток эпикарда *in vitro* использовали метод эксплантной культуры.

Результаты. МСК в составе ТИК после трансплантации сохраняют жизнеспособность и вызывают активацию эпикардального пула клеток и локальное повышение васкуляризации зоны повреждения. Эксперименты *in vitro* показали, что кондиционированная среда МСК оказывает стимулирующее воздействие на миграционную активность клеток эпикарда и вызывает образование активированных Wt1/POD1 клеток-предшественниц.

Адресс для корреспонденции:

Константин Владимирович Дергилев
E-mail: doctorkote@gmail.com

Correspondence to:

Konstantin V. Dergilev
E-mail: doctorkote@gmail.com

Заключение. Трансплантация ТИК на основе пластов МСК представляется рациональным подходом для эффективной доставки жизнеспособных клеток в миокард с целью активирующего воздействия на эпикардальную клеточную нишу и репаративный ангиогенез.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки; инфаркт миокарда; эпикард; васкуляризация; тканеинженерная конструкция; пласт клеток

Aim: to evaluate the impact of tissue-engineered structures (TES) transplantation based on mesenchymal stromal cell (MSC) sheets in myocardial infarction on the activation of the epicardial cell pool and vascularization of the damaged zone.

Materials and methods. Mesenchymal stromal cells were obtained from samples of subcutaneous fat of Wistar rats and C57Bl/6 mice. Tissue engineering structures were obtained by culturing cell sheets on thermosensitive plates (Nunc Dishes with UpCell Surface). Transplantation of TESs was performed after myocardial infarction modeling in rats by ligation of the anterior descending coronary artery. Transplant cells and damaged zones were assessed using immunofluorescent staining of myocardial cryosections. The impact of MSC secretion products on the migration activity of epicardial cells *in vitro* was evaluated using the explant culture method.

Results. MSCs in TESs after transplantation remain viable and induce activation of the epicardial cell pool and local increase of the damaged zone vascularization. The *in vitro* experiments showed that the conditioned environment of MSCs stimulates the migratory activity of epicardial cells and initiates the formation of activated Wt1/POD1 precursor cells.

Conclusion. TES transplantation on the basis of MSC sheets seems to be a promising approach for effective delivery of viable cells into myocardium to activate the epicardial cellular niche and reparative angiogenesis.

Keywords: mesenchymal stem cells; myocardial infarction; epicardium; vascularization; tissue-engineered cellular structure; cellular sheet

DOI:10.15360/1813-9779-2019-6-38-49

Введение

Высокоэффективные процессы репаративной регенерации миокарда характерны для низших позвоночных и рыб, крайне слабо представлены у млекопитающих, что не позволяет миокарду полноценно восстанавливаться при обширных повреждениях и лежит в основе развития многих кардиологических заболеваний. Современная медицина не имеет в своем арсенале средств, позволяющих восстановить утраченные в результате патологических процессов клетки сердца. Решение этой проблемы лежит в области раскрытия эндогенных механизмов, регулирующих процессы репаративной регенерации в сердце, и создания на этой основе новых технологий для их стимуляции. В последние годы значительное внимание исследователей привлекает эпикард и его роль в репарации миокарда после инфаркта. Показано, что клетки мезотелия эпикарда активируются под действием сигналов из поврежденного миокарда, вступают в эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП), а образующиеся мезенхимальные прогениторные клетки эпикарда мезенхимального фенотипа дифференцируются в гладкомышечные клетки и перicytes сосудов, способствуя восстановлению васкуляризации, а также в фибробласты, участвующие в формировании рубца [1]. Помимо этого, участие эпикарда в репарации сердца осуществляется посредством паракринных влияний, в частности, секреции факторов роста, прежде всего,

Introduction

Highly effective reparative myocardial regeneration, typical for lower vertebrates and fish, is extremely poorly represented in mammals, which does not allow the myocardium to fully recover from extensive damage and underlies various heart diseases. Nowadays, contemporary medicine does not possess the necessary tools to restore the heart cells lost due to pathological processes. The problem solution lies in the discovery of endogenous mechanisms regulating the reparative regeneration in the heart and creation of new technologies for their stimulation.

In recent years, the epicardium and its role in myocardial repair after infarction have attracted considerable attention. The epicardial mesothelial cells were shown to be activated by signals from the damaged myocardium, enter the epithelial-mesenchymal transition (EMT), while the resulting mesenchymal progenitor epicardial cells of the mesenchymal phenotype differentiated into smooth muscle cells and vascular pericytes, promoting restored vascularization, as well as into fibroblasts involved in the scar formation [1]. In addition, the epicardium participates in cardiac repair through paracrine effects, in particular, the secretion of growth factors, primarily FGF, and follistatin-like protein-1, which suppresses apoptosis of cardiomyocytes and stimulates their proliferation [2]. In this context, the search for ways to stimulate epicardial activation seems to be a promising strategy for promoting endogenous reparation and re-

FGF, и фоллистатин подобного белка — 1, подавляющего апоптоз кардиомиоцитов и стимулирующего их пролиферацию [2]. В связи с этой ролью эпикарда поиск способов стимуляции его активации представляется перспективной стратегией стимуляции эндогенных репаративных и регенеративных процессов в сердце. В этом направлении особый интерес представляет изучение эффектов локальной эпикардимальной трансплантации простейших тканеинженерных конструкций, состоящих из пластов клеток (англ. *cell sheets*) — своеобразных «клеточных заплаток», состоящих из многослойных клеточных структур в комплексе с наработанным ими же внеклеточным матриксом. Клетки после трансплантации в виде таких конструкций сохраняют жизнеспособность и за счет паракринной активности и высвобождения внеклеточных везикул моделируют микроокружение и генерируют сигналы, активирующие регенеративную программу в окружающих клетках. Наши ранние исследования и работы других научных групп показали безопасность такого вида клеточной терапии, возможность полной интеграции имплантата в ткань сердца, обеспечение длительной жизнеспособности клеток и положительное влияние на репаративные процессы в постинфарктном сердце [3–5]. Однако механизм такого терапевтического воздействия остается малоизученным. Нами было выдвинуто предположение, что трансплантация пластов мезенхимальных стромальных клеток (МСК) жировой ткани на поверхность сердца может активировать пул эпикардимальных клеток-предшественниц, которые путем вступления в эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) и последующей дифференцировки, а также с помощью паракринных механизмов участвуют в репаративных процессах.

Цель исследования — оценить влияние трансплантации тканеинженерных конструкций (ТИК) на основе пластов мезенхимальных стромальных клеток (МСК) при инфаркте миокарда на активацию эпикардимального пула клеток и васкуляризацию зоны повреждения.

Материал и методы

Выделение и культивирование МСК жировой клетчатки крысы и мыши. МСК крысы были выделены из образцов подкожной жировой клетчатки крысы линии Wistar возрастом 12 недель в соответствии с методом, описанном ранее [3]. Жировую ткань измельчали до размера 1–2 мм и обрабатывали раствором коллагеназы I (200 ед/мл), («Sigma», США) и диспазы (30 ед/мл), («Thermo Fisher Scientific Inc», США) в течение 1 часа при 37°C, затем центрифугировали при 200 g, 10 минут, осажденные клетки ресуспендировали и пропускали через нейлоновое сито («BD Bioscience», США) с диаметром пор 40 мкм. Профильтрованную суспензию центрифугировали

generation in the myocardium. In this area, studying the effects of local epicardial transplantation of elementary tissue-engineered structures composed of cell sheets, a kind of «cell patch» consisting of multilayer cell structures in combination with the extracellular matrix produced by them, is of particular interest. Cells embedded into this structure after transplantation remain viable and due to paracrine activity and release of extracellular vesicles model microenvironment and generate signals activating the regeneration program in adjacent cells. Our early studies and the works of other scientific groups have shown the safety of this type of cell therapy, their complete integration into the heart tissue, ensuring the long-term viability of cells and a positive impact on reparation in the post-infarction myocardium [3–5]. However, the mechanism of this therapeutic effect remains poorly understood. We have suggested that the transplantation of mesenchymal stromal cells (MSCs) sheets from adipose tissue to the heart surface may activate a pool of epicardial precursor cells participating in reparation by entering the epithelial-mesenchymal transition (EMT) with further differentiation, as well as through paracrine mechanisms.

This study aimed at assessment of impact of tissue engineering structures (TES) based on mesenchymal stromal cell (MSC) sheets transplantation in myocardial infarction on activation of the epicardial cell pool and the vascularization of the damaged area.

Materials and Methods

Separation and cultivation of MSCs of subcutaneous fatty tissue in rats and mice. The MSCs in 12-week Wistar rats were isolated from samples of subcutaneous fatty tissue in accordance with the previously described technique [3]. The fatty tissue was crushed to particles sized 1–2 mm and then treated with collagenase I solution (200 units/ml) («Sigma», Thermo Fisher Scientific Inc. (USA)) for 1 hour at 37°C, then centrifuged at 200 g for 10 minutes, with the precipitated cells resuspended and passed through a nylon sieve (BD Bioscience, USA) with a pore diameter of 40 µm. A filtered suspension was centrifuged at 200g for 10 min. Cellular precipitate was resuspended in an adipose MSC growth medium DMEM-F12 («Gibco», USA)/10% CFS (calf fetal serum) («ATCC», USA), then placed on Petri dishes and cultured under standard conditions (5% CO₂, 37°C). The next day, loose cells and red blood cells were washed and the medium was replaced. Then, the medium was changed every 2–3 days. Upon reaching 70% of the monolayer, the cells were split 1:3 using 0.05% trypsin solution/0.02% EDTA (PanEco, Russia). The cells used in the experiments were not older than 4 passages. A culture of adipose MSCs from mice C57BL/6 was obtained using a similar protocol.

Obtaining a conditioned MSC medium. Murine MSCs (3rd passage, 2×10⁶ cells/plate) were transferred and aliquoted in 2 plates with an area of 55 cm² in DMEM

при 200 g, 10 мин. Клеточный осадок ресуспендировали в среде для культивирования мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани DMEM-F12 («Gibco», США)/10% ФТС (фетальная сыворотка теленка), («ATCC», США), высаживали на культуральные чашки Петри и культивировали в стандартных условиях (5% CO₂, 37°C). На следующий день отмывали не прикрепившиеся клетки и эритроциты, среду заменяли на свежую. Далее, проводили смену среды каждые 2–3 дня. При достижении 70% моно-слоя клетки рассаживали в соотношении 1:3 с использованием 0,05% раствора трипсина/0,02% ЭДТА («ПанЭко», Россия). В экспериментах использовали клетки не старше 4 пассажа. Получение культуры МСК жировой ткани мыши линии C57BL/6 проводили по сходному протоколу.

Получение кондиционированной среды МСК. МСК мыши 3-го пассажа (2×10⁶ клеток/чашку) высаживали на 2 культуральные чашки площадью 55 см² в среду DMEM («Invitrogen», США), содержащей 10% ФТС, по 100 Ед/мл пенициллина и стрептомицина, 2 мМ L-глутамина. На следующий день чашки дважды промывали фосфатно-солевым буфером и добавляли по 10 мл среды DMEM («Invitrogen») без добавок. Далее, первую чашку инкубировали в условиях нормоксии (21% O₂, 5% CO₂), в вторую в условиях гипоксии (1% O₂, 5% CO₂) при 37°C в течение 48 часов. Затем профильтрованную среду центрифугировали при 300 g в течение 10 мин и хранили при –70°C.

Исследования влияния кондиционированной среды МСК на миграцию эпикардиальных клеток из эксплантов. Сердце неонатальной мыши C57BL/6 (2 дня после рождения) иссекали, измельчали с помощью скальпеля под контролем микроскопа до размера кусочков 2 мм и высаживали (эпикардиальным слоем к поверхности) на культуральные чашки, покрытые 1% желатином в одну из нижеуказанных сред: а) контрольная среда (DMEM («Invitrogen») без добавок); б) среда МСК, предкультивированных в условиях гипоксии; в) среда МСК, предкультивированных в условиях нормоксии. Культивирование эксплантной культуры проводили в течение 72 часов. Фиксацию изображений проводили с помощью микроскопа Zeiss Axiovert 200 M («Carl Zeiss», Германия), количественный подсчет клеток эпикарда выполнялся с помощью программы Image J software («National Institute of health», США).

Характеристика иммунофенотипа эпикардиальных клеток *in vitro*. Анализ иммунофенотипа клеток эксплантной культуры проводили с помощью иммуноцитохимии. Клетки окрашивали антителами к маркерам Wt1 («Abcam», США), POD1 («Santa Cruz», США), бета катенин («Abcam», США) в течение 1 часа, затем промывали и окрашивали антителами, конъюгированными с AlexaFluor488 («Invitrogen», США, 1:800, 1 ч при 37°C). Для визуализации актинового цитоскелета проводили дополнительное окрашивание фаллоидином, конъюгированным с красителем Alexa Fluor™ 594 («Thermo Fisher Scientific Inc», США, 1:200, 20 минут при 37°C). Ядра клеток окрашивали с помощью DAPI (4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride («Sigma», США).

Получение ТИК на основе пластов МСК. Для получения клеточных пластов МСК высеивали в тер-

(«Invitrogen», USA), containing 10% calf fetal serum (CFS), 100 U/ml of penicillin and streptomycin, 2 mM L-glutamine. The next day, the plates were washed twice with phosphate buffered saline (PBS), and 10 ml of DMEM («Invitrogen») were added without any additives. Then, the first plate was incubated in normoxia (21% O₂, 5% O₂), the second one was incubated in hypoxia (1% O₂, 5% O₂) at 37°C for 48 hours. Then the filtered medium was centrifuged at 300 g for 10 min and stored at -70°C.

Influence of the conditioned MSC medium on migration of epicardial cells from explants. The hearts of neonatal mice C57BL/6 (2 days after birth) was dissected and minced with a scalpel under the microscope to pieces sized 2 mm and seeded (with the epicardial layer facing surface) on plates pre-covered with 1% gelatin in one of the following media: a) control medium (DMEM («Invitrogen») without additives); b) medium harvested from MSCs pre-cultivated in hypoxia condition; c) medium of MSCs pre-cultivated in normoxia. The explant culture was cultivated for 72 hours. Images were obtained using the Zeiss Axiovert 200 M microscope («Carl Zeiss», Germany), and the quantitative calculation of epicardial cells was done using the ImageJ software («National Institutes of Health», USA).

In vitro characteristics of the epicardial cell immunophenotype. Immunophenotype analysis of explant culture cells was performed by immunocytochemistry. The cells were stained with antibodies to Wt1 («Abcam», USA), POD1 («Santa Cruz», USA) and beta catenin («Abcam», USA) markers for 1 hour, then washed and stained with secondary antibodies conjugated with AlexaFluor 488 («Invitrogen», USA, 1: 800, 1 h at 37°C). To visualize the actin cytoskeleton, additional staining with Alexa Fluor™ 594 dye-conjugated phalloidin was performed (Thermo Fisher Scientific Inc, USA, 1:200, 20 minutes at 37°C). Cell nuclei were stained with DAPI (4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride) («Sigma», USA).

Obtaining TESs from MSC sheets. In order to obtain cellular sheets, MSCs were seeded into heat-sensitive plates (300,000 cells/cm²) Nunc Dishes with UpCell Surface («Thermo Scientific», USA). MSCs were pre-methylated with fluorescent membrane dye (PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit for General Cell Membrane Labeling dye («Sigma», USA). The cells were cultivated for 72 h in the DMEM/F12 medium (Invitrogen, USA) containing 10% CFS, 100 U/ml penicillin and streptomycin, 2 mM L-glutamine. To detach the cellular sheets, the plates were placed on a refrigerant and incubated at room temperature. Cellular sheets were transferred using a low-adhesion membrane («Thermo Scientific», USA).

The characteristics of cell sheets based on MSCs. Frozen TES cryosections were fixed with 3.7% paraformaldehyde (20 minutes at 37°C) and washed with a PBS. Myocardial sections were blocked with a solution containing 1% bovine serum albumin (BSA) and 10% donor serum of second antibodies in PBS (30 min). After that, the cryosections were stained with antibodies to Ki-67 markers (Abcam, USA), cleaved caspase-3 (Cell Signaling Technology, USA), and connexin 43 (ThermoFisher Scientific, USA), collagen I («Bio-Rad», USA), fibronectin («Abcam», USA) for 1 hour, then were washed and stained with antibodies conjugated with Alexa Fluor™ 488 («Invitrogen», USA, 1:800, 1 h at 37°C). The cell nuclei were stained with DAPI. Estimation of the number of nuclei per unit of area, diameter and thickness of TESs was

мочувствительные культуральные чашки (300 000 клеток/см²) Nunc Dishes with UpCell Surface («Thermo Scientific», США). Предварительно МСК метили флуоресцентным мембранным красителем (PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit for General Cell Membrane Labeling dye («Sigma», США)). Клетки культивировали в течение 72 ч в среде DMEM/F12 («Invitrogen», США), содержащей 10% ФТС, по 100 Ед/мл пенициллина и стрептомицина, 2 мМ L-глутамин. Для открепления клеточных пластов культуральные чашки помещали на хладагент и инкубировали при комнатной температуре. Перенос клеточных пластов осуществляли с помощью низкоадгезионной мембраны («Thermo Scientific», США).

Характеристика пластов клеток на основе МСК. Замороженные криосрезы ТИК фиксировали 3,7% параформальдегидом (20 минут при 37°C) и промывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ). Срезы миокарда блокировали раствором, содержащим 1% бычьего сывороточного альбумина (БСА), 10% сыворотки донора вторых антител в ФСБ (30 мин). После этого криосрезы окрашивали антителами к маркерам Ki-67 («Abcam», США), активированной каспазе-3 (cleaved caspase-3), («Cell signaling», США), коннексину 43 («ThermoFisher Scientific», USA), коллагену I («BioRad», USA), фибронектину («Abcam», USA) в течение 1 часа, затем промывали и окрашивали антителами, конъюгированными с Alexa Fluor™ 488 («Invitrogen», США, 1:800, 1 ч при 37°C). Ядра клеток окрашивали с помощью DAPI. Оценку количества ядер на единицу площади, диаметра и толщины ТИК проводили с помощью микроскопа Zeiss Axiovert 200 M («Carl Zeiss», Германия) и программного обеспечения Axiovision 3.1 («Carl Zeiss», Германия).

Моделирование инфаркта миокарда (ИМ) и трансплантация ТИК. Эксперименты по трансплантации ТИК проводили на самцах крыс линии Wistar, приобретенных в питомнике лабораторных животных «Пушино» (Пушино, Россия). Эвтаназию крыс проводили после ингаляционной наркотизации Изофлораном методом дислокации шейного отдела позвоночника. Все необходимые манипуляции выполняли в соответствии с Директивой ЕС 2010/63 / ЕС по экспериментам на животных и были одобрены этическим комитетом института (Национальный центр медицинских исследований кардиологии, разрешение № 385.06.2009). Инфаркт миокарда был индуцирован путем перевязки передней нисходящей коронарной артерии у крыс Wistar с помощью способа, описанного ранее [6]. Экспериментальных животных разделили на 2 группы: 1) контрольная группа; 2) группа эпикардальной трансплантации ТИК. Для последующей оценки пролиферативной активности клеток в составе трансплантированной ТИК использовали раствор БРДУ (бромдезоксифуридина) в ФСБ (10 мг/мл), который вводили интраперитонеально (200 мкл, 1 раз в сутки). Эвтаназию животных выполнили через 5 дней после трансплантации клеточных пластов.

Гистологическая оценка состояния клеток трансплантата и васкуляризации. Замороженные криосрезы миокарда фиксировали 3,7% параформальдегидом (20 минут при 37°C) и промывали ФСБ. Срезы миокарда блокировали раствором, содержащим 1% БСА, 10% сыворотки донора вторых антител

done using the Zeiss Axiovert 200 M microscope («Carl Zeiss», Germany) and Axiovision 3.1 software («Carl Zeiss», Germany).

Myocardial infarction (MI) modelling and TES transplantation. TES transplantation experiments were carried out on male Wistar rats purchased in the laboratory animal nursery «Pushchino» (Pushchino, Russia). The rats were euthanized after Isoflurane inhaled anesthesia by cervical spine dislocation. All the necessary manipulations were performed in accordance with the EU Directive 2010/63/EU on animal experimentation and were approved by the Institute's Ethical Committee (National Center for Cardiology Medical Research, Resolution No. 385.06.2009). Myocardial infarction was induced by ligating the anterior descending coronary artery in Wistar rats using the technique described earlier [6]. The experimental animals were divided into 2 groups: 1) control group; 2) epicardial TES transplantation group. For further evaluation of the cell proliferation in the transplanted TES, a BDU (bromodeoxyuridine) solution in PBS (10 mg/ml) was used, which was injected intraperitoneally (200 µl, once a day). The animals were euthanized 5 days after the cell sheet transplantation.

Histological assessment of transplant cells and vascularization. Frozen myocardial cryosections were fixed with 3.7% paraformaldehyde (20 minutes at 37°C) and washed by FSB. Myocardial sections were blocked with a solution containing 1% BSA and 10% serum of the second antibody donor in PBS (30 min). The cryosections were then stained with antibodies to BDU markers (R&D, USA), Ki-67 (Abcam, USA), Wt1 (Abcam, USA), Pecam (CD31) (Becton Dickinson, USA) for 1 hour, then washed and stained with antibodies conjugated with Alexa Fluor™ 488 (Invitrogen, USA, 1:800, 1 h at 37°C).

Vascular network density analysis under the TES transplant area was performed by counting CD31-positive structures. The data were presented as the number of vessels per vision field.

Microscopy and image analysis. Myocardial cells and cryosections were studied using the Zeiss Axiovert 200 M fluorescent microscope («Carl Zeiss», Germany) and Axiovision 3.1 software («Carl Zeiss», Germany).

Statistical data analysis. Data were presented as average ± SD. Statistical significance was assessed using the Mann–Whitney test and Statistica 8.0 software package (Statsoft, USA).

Results and Discussion

Cell integration and survival after transplantation are the key factors ensuring cellular function and reparation, which determines the efficacy of cell therapy. To deliver these characteristics, cell sheet-like structures have been developed consisting of cell sheets in combination with the extracellular matrix proteins they produce (Fig. 1). The sheets showed a high level of cell compactization (722 ± 198 cells/ 100 µm²), which corresponds to the cell organization density within the native/intact myocardium (502 ± 112 cells/100 µm²). The structure was a multilayer system consisting of 11–14 layers of cells interacting through connexin-43 containing gap junctions and surrounded by extracellular matrix proteins (collagen I and fibronectin).

в ФСБ (30 мин). После этого криосрезы окрашивали антителами к маркерам БРДУ («R&D», США), Ki-67 («Abcam», США), Wt1 («Abcam», США), Pecam (CD31) («Becton Dickinson», США), в течение 1 часа, затем промывали и окрашивали антителами, конъюгированными с Alexa Fluor™ 488 («Invitrogen», США, 1: 800, 1 ч при 37°C).

Анализ плотности сосудистой сети под областью трансплантации ТИК проводили путем подсчета CD31-позитивных структур. Данные представили в формате количество сосудов в поле зрения.

Микроскопия и анализ изображений. Анализ клеток и криосрезов миокарда проводили с использованием флуоресцентного микроскопа Zeiss Axiovert 200 M («Carl Zeiss», Германия) и программного обеспечения Axiovision 3.1 («Carl Zeiss», Германия).

Статистический анализ данных. Данные представили в формате среднее $\pm$ SD. Статистическую оценку достоверности различий проводили с использованием теста Манна-Уитни и программного пакета Statistica 8.0 («Statsoft», США).

Результаты и обсуждение

Интеграция, выживаемость клеток после трансплантации является ключевыми факторами, обеспечивающими функционирование клеток, выполнение репаративных функций, что определяет эффективность клеточной терапии. Для обеспечения этих характеристик были разработаны конструкции (по типу «cell sheet»), состоящие из пластов клеток в комбинации с белками внеклеточного матрикса, который они нарабатывают (рис. 1). Показали, что в составе пластов отмечается высокий уровень компактизации клеток (722 ± 198 клеток/ 100 мкм^2), который соотносится с плотностью организации клеток в составе нативного/неповрежденного миокарда (502 ± 112 клеток/ 100 мкм^2). Конструкция представляла собой многослойную структуру, состоящую из 11–14 слоев клеток, взаимодействующих через коннексин-43 содержащие щелевые контакты и окруженные белками внеклеточного матрикса (коллаген I и фибронектин). Средний диаметр сформированного пласта составлял $1,25 \pm 0,09$ см, а толщина — $94,4 \pm 12$ мкм.

Трансплантация сформированной конструкции после ИМ приводило к ее адгезии к наружной эпикардальной поверхности сердца и интеграции в ткань миокарда (рис. 2). Пока-

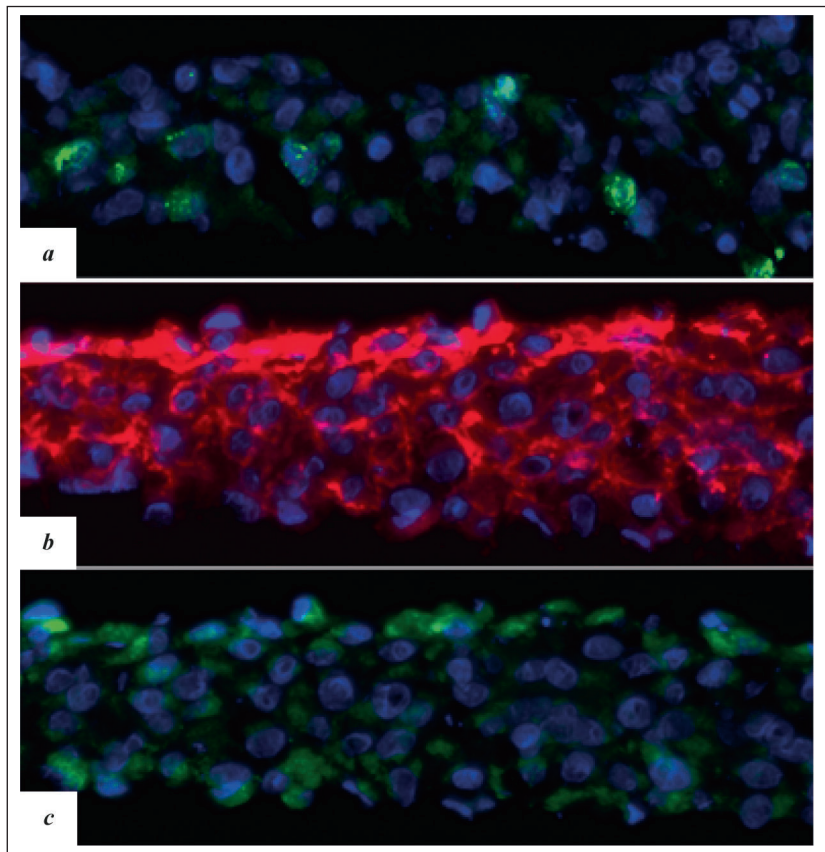


Рис. 1. Характеристика клеточных пластов на основе МСК.

Fig. 1. Features of MSC-based cell sheets.

Note. The representative images of cellular sheet sections stained with antibodies to Ki67 (a, green) proliferation markers and extracellular matrix proteins such as fibronectin (b, red) and collagen 1 (c, green). Cell nuclei are stained with DAPI.

Примечание. Репрезентативные изображения окрашивания срезов пластов клеток антителами к маркерам пролиферации Ki67 (a, зеленый), белкам внеклеточного матрикса: фибронектин (b, красный) и коллаген 1 (c, зеленый). Ядра клеток окрашены DAPI.

The average diameter of the resulting sheet was 1.25 ± 0.09 cm, and its thickness was $94.4 \pm 12 \text{ }\mu\text{m}$.

Transplantation of the elaborated structure after MI resulted in its adhesion to the external epicardial surface of the heart and its integration into the myocardial tissue (Fig. 2). The cells in the structure were shown to remain viable, as evidenced by the positive staining for BDU and Ki67 markers. In 5 days after the transplantation, there was a significant increase in the thickness of the subepicardial layer including Wt1+ cells consistent with the activated epicardial cells. Quantitative analysis showed that the average number of Wt1+ cells and their distribution area in the myocardium was significantly higher in the transplantation group in comparison with the control group (192 ± 82 and 43 ± 36 cells per vision field; 191.822 ± 21.346 vs $45.117 \pm 30.812 \text{ }\mu\text{m}^2$ ($P < 0.05$), respectively). In addition, the length of the «cellular pathway» from the external heart surface to the localization zone of Wt1 cells in the cell sheet transplantation group was significantly longer than in the control group, which indicates a more significant cell migratory activity in the underlying my-

зали, что клетки в составе конструкции сохраняют жизнеспособность, о чем свидетельствовало положительное окрашивание на маркеры БРДУ и Ki67. Обнаружили, что через 5 дней после трансплантации отмечалось значительное увеличение толщины субэпикардального слоя, в составе которого располагались Wt1+ клетки, характеризующие активированные клетки эпикарда. Количественный анализ показал, среднее количество Wt1+ клеток, а также площадь их распределения в миокарде была значительно выше в группе трансплантации, в сравнении с контрольной группой (192 ± 82 и 43 ± 36 клеток в поле зрения; 191822 ± 21346 и 45117 ± 30812 $\mu\text{м}^2$ ($p < 0,05$), соответственно). Кроме того, длина «клеточного пути» от наружной поверхности сердца до зоны локализации Wt1 клеток в группе с трансплантацией клеточных пластов была значительно больше, чем в контроле, что указывает на более выраженную миграционную активность клеток в подлежащие слои миокарда (212 ± 39 и 53 ± 34 $\mu\text{м}$ ($p < 0,05$), соответственно). Учитывая наличие признаков активации клеток эпикарда после трансплантации клеточных пластов, провели исследования *in vitro* для оценки влияния продуктов секреции МСК на миграционную активность эпикардальных прогениторных клеток. Выявили, что воздействие среды культивирования МСК существенно увеличивало количество образованных эпикардальных клеток и их миграционную активность (рис. 3). Статистически значимых различий по числу клеток эксплантной культуры, образованных под действием среды МСК, культивированных в нормоксических и гипоксических условиях, не выявили. Клетки экспланта имели «cobblestone» морфологию и характеризовались экспрессией транскрипционных факторов (Wt1 и POD1) — маркеров активации клеток эпикарда, что указывало на их эпикардальную принадлежность. Обращало внимание то, что при культивировании в среде МСК часть клеток эпикарда, расположенных по периферии, приобретала веретенообразную форму, что косвенно может свидетельствовать об их вступлении в ЭМП и приобретении мезенхимального фенотипа.

Иммунофлуоресцентное окрашивание срезов миокарда показало, что к 5 дню после инфаркта отмечается интенсивное образование капилляров и артериол (рис. 2 *c, d*), как в зоне некроза, так и в перинфарктных областях. Кроме того, обнаружили выраженную васкуляризацию трансплантированного клеточного графта, который содержал сосуды разного калибра. При этом мы не выявили со-локализации флуоресцентного красителя РКН26 и маркера эндотелия Ресам, что указы-

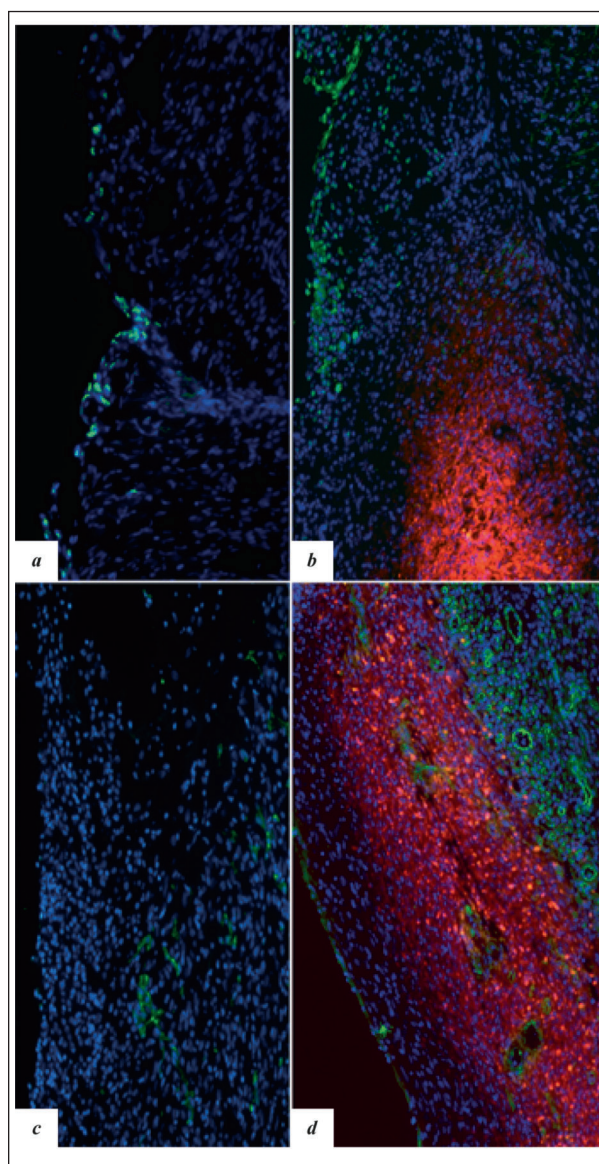


Рис. 2. Активация Wt1+ клеток и ангиогенеза после инфаркта миокарда после трансплантации клеточных пластов на основе МСК и в контрольных сердцах.

Fig. 2. Activation of Wt1+ cells and angiogenesis after myocardial infarction after MSC-based cell sheet transplantation and in the control group.

Note. Immunofluorescent staining of myocardium with antibodies to the marker of activated Wt1 epicardial cells in control samples (*a*) and after cell sheet transplantation (*b*). The transplanted cells in the sheets were marked with fluorescent dye PKH26 (*b*, red); immunofluorescent staining of myocardial tissue with antibodies to CD31 vascular marker in control samples (*c*) and after cell sheet transplantation (*d*). The transplanted cells in the sheets are marked with fluorescent dye PKH26 (*d*, red); cell nuclei are stained with DAPI.

Примечание. Иммунофлуоресцентное окрашивание ткани сердца антителами к маркеру активированных эпикардальных клеток Wt1 в контрольных образцах (*a*) и после трансплантации клеточного пласта (*b*). Трансплантированные клетки в составе пластов помечены флуоресцентным красителем РКН26 (*b*, красный); иммунофлуоресцентное окрашивание ткани миокарда антителами к маркеру сосудов CD31 в контрольных образцах (*c*) и после трансплантации клеточного пласта (*d*). Трансплантированные клетки в составе пластов помечены флуоресцентным красителем РКН26 (*d*, красный); Ядра клеток окрашены DAPI.

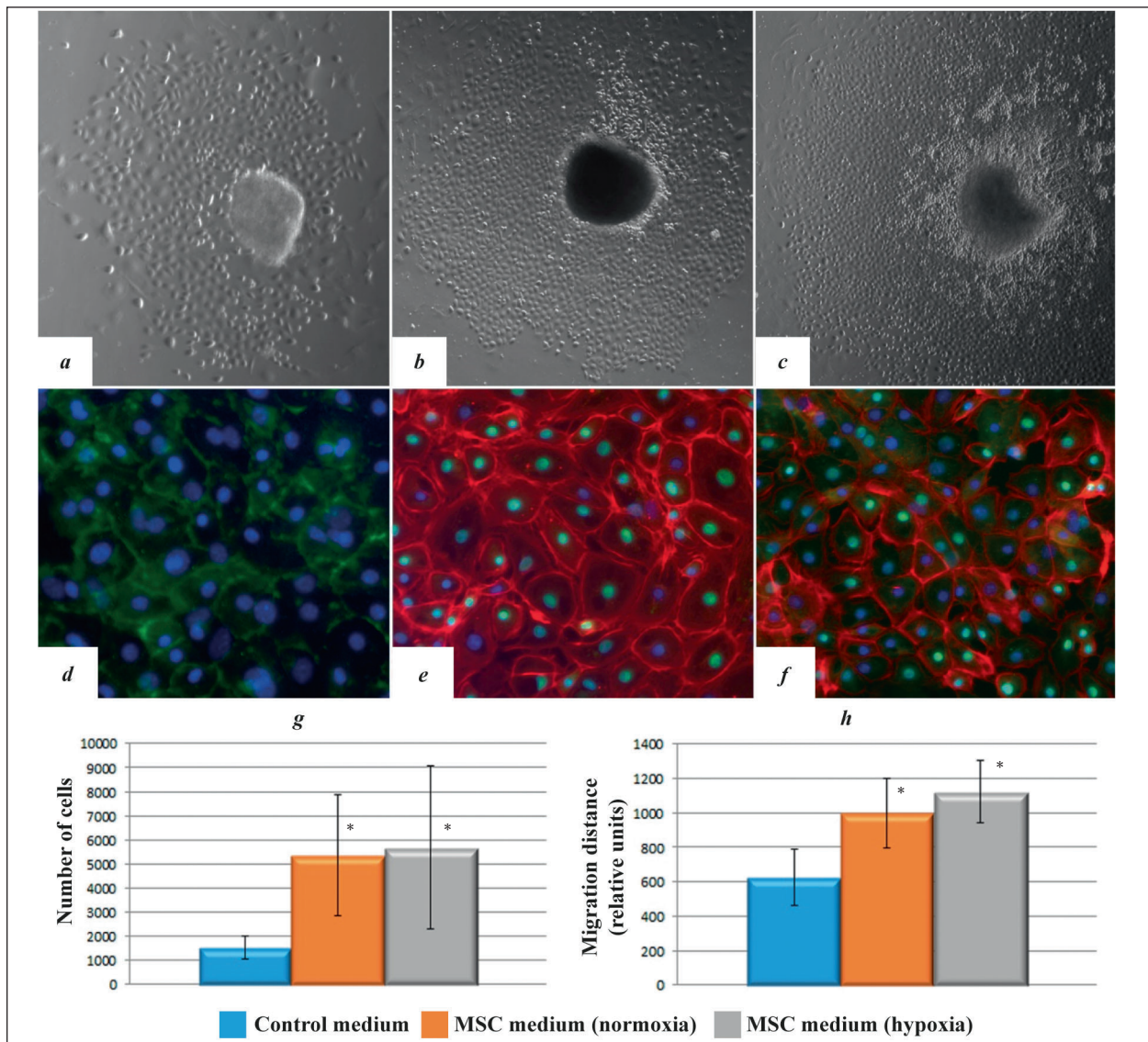


Рис. 3. Миграция эпикардиальных клеток в эксплантной культуре под действием контрольной среды и кондиционированных сред МСК.

Fig. 3. Migration of epicardial cells in an explant culture after exposure to the control medium and conditioned MSC media.

Note. Migration of epicardial cells from explants: *a* — when grown in a control medium; *b* — when exposed to the medium of MSCs grown in normoxia; *c* — when exposed to the medium of MSCs grown in hypoxia; *d, e, f* — representative images of immunofluorescent staining of epicardial cells with antibodies to beta-catenin (*d*, green), Wt1 (*e*, green), POD1 (*f*, green), fibrillary actin (*e* and *f*, red) markers. Cell nuclei are stained with DAPI. Assessment of the migrating epicardial cells number (*g*) and the migration distance (*h*) when grown in control medium and conditioned MSC media. * — differences are statistically significant in comparison with the control, $P < 0.05$.

Примечание. Миграция эпикардиальных клеток из эксплантов: *a* — при культивировании в контрольной среде; *b* — при воздействии среды МСК, культивированных в условиях нормоксии; *c* — при воздействии среды МСК, культивированных в условиях гипоксии; *d, e, f* — репрезентативные изображения иммунофлуоресцентного окрашивания клеток эпикарда антителами к маркерам: бета-катенин (*d*, зеленый), Wt1 (*e*, зеленый), POD1 (*f*, зеленый), фибриллярный актин (*e* и *f*, красный). Ядра клеток окрашены DAPI. Анализ количества мигрирующих клеток эпикарда (*g*) и длины миграционного пути (*h*) при культивировании в контрольной среде и кондиционированных средах МСК. Number of cells — число клеток; — среда; control — контрольная; MSC — МСК; normoxia — нормоксия; hypoxia — гипоксия; migration distance (relative units) — расстояние миграции (относительные единицы). * — статистически достоверные различия по сравнению с контролем, $p < 0,05$.

вает на формирование сосудов исключительно на основе эндогенных эндотелиальных клеток. Более того, обнаружили увеличение количества сосудов под трансплантированным графтом, в сравнении с контрольными образцами (456 ± 69 и 303 ± 58 сосудов в поле зрения ($p < 0,05$), соответственно), причем сосуды также были образованы исключительно клетками животного-реципиента (без флуоресцентной метки).

ocardial layers (212 ± 39 vs $53 \pm 34 \mu\text{m}$ ($P < 0.05$), respectively). Since epicardial cells showed signs of activation after cellular sheet transplantation, *in vitro* studies were performed to evaluate the effect of MSC secretion products on the migration activity of epicardial progenitor cells. Exposure to MSC growth medium was found to significantly increase the number of newly produced epicardial cells and their migration activity (Fig. 3). No statistically sig-

Острое нарушение коронарного кровообращения вызывает гибель не только значительного количества кардиомиоцитов, но и эпителиоподобных клеток мезотелия, которые образуют наружный слой сердца — эпикард. Клетки эпикарда играют ключевую роль в период эмбриогенеза в развитии миокарда, коронарных артерий, проводящей системы, клапанов сердца [7–10], а также являются клеточными регуляторами восстановительных процессов в сердце после инфаркта. В нормальном состоянии эпикард представлен тонким слоем мезотелия, клетки которого находятся в состоянии покоя. При повреждении миокарда происходит реактивации эмбриональной программы экспрессии генов в клетках эпикарда (Wt1, Raldh2 и Tbx18) [11–13], что ведет к запуску ЭМП, их пролиферации и миграции с образованием эпикардальных прогениторных клеток (ЭПК) мезенхимального фенотипа [14, 15]. В субэпикардальной области ЭПК могут дифференцироваться в перicytes и гладкомышечные клетки сосудов [16–21], фибробласты [22], а по данным ряда исследований в эндотелиальные клетки и кардиомиоциты [23, 24]. Кроме того, пул ЭПК после повреждения может выступать в качестве источника биологически активных молекул, способствующих активации регенеративных процессов [1]. Эти свойства эпикарда делают его перспективной мишенью для воздействий, направленных на стимуляцию этих процессов. Результаты данного исследования показали, что локальная эпикардальная трансплантация сформированных *in vitro* тканеинженерных конструкций в виде клеточных пластов из МСК и наработанного ими внеклеточного матрикса после экспериментального инфаркта стимулирует эпикард, что проявляется в активации пролиферации эпикардальных клеток, повышении синтеза белков внеклеточного матрикса и утолщении субэпикардального слоя. Стимулом к такой активации является паракринное действие уникального коктейля ростовых факторов, цитокинов, антиоксидантов и микроРНК, секретируемых и высвобождаемых в виде экзосом/микровезикул клетками трансплантата. Наши предыдущие исследования, а также данные других научных групп указывают, что секретом МСК включает значительное количество биоактивных факторов [25–27] и внеклеточных везикул, в основном экзосом, продукция которых существенно увеличивается в условиях гипоксии [28–30]. Все эти факторы могут служить потенциальными регуляторами активации клеток эпикарда. На модели кардиальных эксплантов мы показали, что продукты секреции МСК, культивированных в состоянии как нормоксии, так и гипоксии, способны усиливать миграцию эпикардальных клеток, часть кото-

нificant differences in the number of explant culture cells developed after the MSC medium exposure and grown under normoxic and hypoxic conditions were revealed. The explant cells had «cobblestone» morphology and expressed the transcription factors (Wt1 and POD1) — characteristic of epicardial cell activation, which indicated their epicardial character. Noticeably, when cultivated in MSC medium, a part of peripherally located epicardial cells acquired a spindle-like shape, which may indirectly indicate their entry into the EMT and mesenchymal phenotype acquisition.

Immunofluorescent staining of myocardial sections showed that by Day 5 after MI intensive formation of capillaries and arterioles was observed (Fig. 2 c, d), both in the necrosis zone and in peri-infarction regions. In addition, there was a marked vascularization of the transplanted cellular graft containing vessels of different calibers. At the same time, we did not detect co-localization of the fluorescent dye PKH26 and the marker of endothelium Pecam, which indicates the formation of vessels was entirely based on endogenous endothelial cells. Moreover, we found an increase in the number of vessels under the transplanted graft compared to the control samples (456 ± 69 vs 303 ± 58 vessels per vision field ($P < 0.05$), respectively), and the vessels were also formed exclusively by the cells of the recipient animal (without fluorescent marker).

Acute coronary occlusion causes death of both numerous cardiomyocytes and epithelial-like mesothelial cells, which form the epicardium. Epicardial cells play a key role in the development of myocardium, coronary arteries, conduction system, and heart valves during the embryogenesis period [7–10], as well as they are cellular regulators of myocardial regeneration after MI. Normally, epicardium consists of a thin layer of mesothelium with quiescent cells. In myocardial damage, the reactivation of the embryonic gene expression program in epicardial cells (Wt1, Raldh2, and Tbx18) occurs [11–13], which leads to the launch of EMT, their proliferation and migration to form epicardial progenitor cells (EPC) of the mesenchymal phenotype [14, 15], in the subepicardial region, EPCs can differentiate into pericytes and vascular smooth muscle cells [16–21], fibroblasts [22], and according to several studies into endothelial cells and cardiomyocytes [23, 24]. In addition, after damage, the EPC pool can act as a source of biologically active molecules promoting the activation of regeneration [1]. These properties make the epicardium a promising target for the effects aimed at stimulating the above processes. The results of this study showed that local epicardial transplantation of tissue-engineered structures formed *in vitro* as cell sheets from MSCs and their extracellular matrix after an experimental infarction stimulates the epicardium, which results in activation of epicardial cell proliferation, increase in the production of extracellular matrix proteins, and thickening of

рых приобретает мезенхимоподобные характеристики, что указывает на их вступление в ЭМП, необходимый для репарации. Помимо паракринного воздействия механизмом активации эпикарда может служить контактное взаимодействие клеток трансплантата с эпикардальным клеточным слоем. Ранее, мы показали, что МСК в составе клеточного пласта несут на своей поверхности лиганды Jagged 1 и Delta-like 4 [31], которые при взаимодействии с рецепторами Notch на поверхности клеток эпикарда могут вызывать их активацию, сопровождающуюся формированием сосудистых клеток-предшественниц [32–34]. Оба механизма активации эпикарда клетками трансплантированного пласта могут способствовать образованию новых сосудов, что может объяснять увеличение васкуляризации зоны повреждения, особенно выраженное в субэпикардальной зоне, обнаруженное в данной работе. Помимо активации эпикарда важным механизмом стимуляции васкуляризации после инфаркта может служить комбинированное действие биоактивных компонентов секретора трансплантированных МСК и клеток активированного эпикарда. Все эти компоненты, обладающие ангиогенными и антиапоптотическими свойствами, могут способствовать более быстрому восстановлению кровоснабжения, подавлению апоптоза клеток в зоне повреждения и стимуляции пролиферации. Более того, секреция МСК молекул хемоаттрактантов, таких как MCP1, усиливает рекрутирование циркулирующих моноцитов в поврежденные участки сердца, где они могут способствовать ангиогенезу, секретируя ангиогенные факторы и дифференцируясь в эндотелиальные клетки [28, 29]. Реализации всех регенеративных свойств МСК оказывается возможной за счет поддержания жизнеспособности трансплантированных клеток в составе клеточного пласта, что показано в ряде работ [4, 5]. В более широком понимании клеточный пласт формирует некую подложку—«микроокружение» для клеток эпикарда, подобную той, что присутствует в субэпикардальной области неповрежденного сердца. Вероятно, это свойство обусловлено способностью МСК к построению микросреды (подобной микроокружению в периваскулярных или нишах костного мозга), которая сохраняется у этих клеток даже после этапа длительного культивирования *in vitro*.

Заключение

Эпикардальная трансплантация пластов клеток на основе МСК после экспериментального ИМ активирует пул эпикардальных клеток и способствует развитию ранней васкуляризации зоны повреждения, что может быть

the subepicardial layer. Such activation is stimulated by the paracrine action of a unique cocktail of growth factors, cytokines, antioxidants and microRNAs secreted and released as exosomes/ microvesicles by transplant cells. Our previous studies, as well as data from other scientific groups, have shown that the MSC secrete a significant number of bioactive factors [25–27] and extracellular vesicles, mainly exosomes, which are increasingly produced in hypoxia [28–30]. All these factors can serve as potential regulators of epicardial cell activation. On the cardiac explant model, we showed that the secretion products of MSCs grown in both normoxia and hypoxia are capable of enhancing migration of epicardial cells, some of which acquire mesenchymal characteristics indicating their entry into epithelial-mesenchymal transition (EMT) required for repair. In addition to the paracrine effect, the mechanism of epicardial activation can include the contact interaction of the transplant cells with the epicardial cell layer. Earlier, we demonstrated that MSCs in the cell sheet carry Jagged 1 and Delta-like 4 ligands on their surface [31], which, when interacting with Notch receptors on the epicardial cell surface, may cause their activation accompanied by the formation of precursor vascular cells [32–34]. Both mechanisms of epicardial activation by the transplant sheet cells may promote the formation of new vessels, which may explain the increase in the vascularization of the damaged zone, especially evident in the subepicardial zone discovered in this study. In addition to the epicardial activation, the combined action of bioactive components of the secretome of transplanted MSCs and activated epicardial cells may serve as an important mechanism for stimulating vascularization after MI. All these components with angiogenic and antiapoptotic properties may contribute to faster restoration of blood supply, apoptosis suppression in the damaged area and stimulation of proliferation. Moreover, MSCs produce chemoattractant molecules, such as MCP1, enhancing the recruitment of circulating monocytes into the damaged myocardial regions, where they can participate in angiogenesis by secreting angiogenic factors and differentiating into endothelial cells [28, 29]. Several studies have shown that the regenerative properties of MSCs can be maintained by the viable transplanted cells in the cell sheet [4, 5]. In a broader sense, the cellular sheet forms a «microenvironment» for epicardial cells, similar to that found in the subepicardial region of the undamaged myocardium. This property is probably due to the ability of MSCs to create microenvironmental conditions (similar to those in perivascular or bone marrow niches), which persists even after long-term *in vitro* culturing.

Conclusion

Epicardial cell sheet transplantation based on MSCs after experimental MI activates the epicardial cell pool and promotes early vascularization of the

важным фактором для осуществления эффективной репарации.

Таким образом, трансплантация ТИК на основе пластов МСК представляется рациональным подходом для эффективной доставки жизнеспособных клеток в миокард с целью активирующего воздействия на эпикардальную клеточную нишу и репаративный ангиогенез.

Благодарность.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ №19-15-00384.

Литература

1. Cao J., Poss K.D. The epicardium as a hub for heart regeneration. *Nat Rev Cardiol.* 2018; 15 (10): 631–647. DOI: 10.1038/s41569-018-0046-4.
2. Wei K., Serpooshan V., Hurtado C., Diez-Cuñado M., Zhao M., Maruyama S., Zhu W., Fajardo G., Nosedá M., Nakamura K., Tian X., Liu Q., Wang A., Matsuura Y., Bushway P., Cai W., Savchenko A., Mahmoudi M., Schneider M.D., van den Hoff M.J., Butte M.J., Yang P.C., Walsh K., Zhou B., Bernstein D., Mercola M., Ruiz-Lozano P. Epicardial FSTL1 reconstitution regenerates the adult mammalian heart. *Nature.* 2015; 525 (7570): 479–485. DOI: 10.1038/nature15372
3. Дергилев К. В., Цоколаева З. И., Рыжков И. А., Парфенова Е. В. Трансплантация пластов мезенхимальных прогениторных клеток сердца для васкуляризации миокарда после инфаркта. *Общая реаниматология.* 2018; 14 (6): 28–40 DOI: 10.15360/1813-9779-2018-6-28-40
4. Dergilev K.V., Tsokolayeva Z.I., Beloglazova I.B., Ratner E.I., Parfyonova E.V. Epicardial Transplantation of Cardiac Progenitor Cells Based Cells Sheets is More Promising Method for Stimulation of Myocardial Regeneration, Than Conventional Cell Injections. *Kardiologiya.* 2019; 59 (5): 53–60. DOI: 10.18087/cardio.2019.5.2597. PMID: 31131768
5. Dergilev K., Tsokolayeva Z., Makarevich P., Beloglazova I., Zubkova E., Boldyreva M., Ratner E., Dykanov D., Menshikov M., Ovchinnikov A., Ageev F., Parfyonova Y.C. Kit Cardiac Progenitor Cell Based Cell Sheet Improves Vascularization and Attenuates Cardiac Remodeling following Myocardial Infarction in Rats. *Biomed Res Int.* 2018 Jun 25; 2018: 3536854. DOI: 10.1155/2018/3536854. eCollection 2018. PMID: 30046593
6. Traktuev D.O., Tsokolayeva Z.I., Shevelev A.A., Talitskiy K.A., Stepanova V.V., Johnstone B.H., Rahmat-Zade T.M., Kapustin A.N., Tkachuk V.A., March K.L., Parfyonova Y.V. Urokinase gene transfer augments angiogenesis in ischemic skeletal and myocardial muscle. *Mol Ther.* 2007; 15 (11): 1939–46. Epub 2007 Jul 24. PMID: 17653104
7. Gittenberger-de Groot A.C., Vrancken Peeters M.P., Bergwerff M., Mentink M.M., Poelmann R.E. Epicardial outgrowth inhibition leads to compensatory mesothelial outflow tract collar and abnormal cardiac septation and coronary formation. *Circ Res.* 2000; 87 (11): 969–971. PMID: 11090540 DOI: 10.1161/01.res.87.11.969
8. Pérez-Pomares J.M., Carmona R., González-Iriarte M., Atencia G., Wesels A., Muñoz-Chápuli R. Origin of coronary endothelial cells from epicardial mesothelium in avian embryos. *Int J Dev Biol.* 2002; 46 (8): 1005–1013. PMID: 12533024
9. Poelmann R.E., Lie-Venema H., Gittenberger-de Groot A.C. The role of the epicardium and neural crest as extracardiac contributors to coronary vascular development. *Tex Heart Inst J.* 2002; 29 (4): 255–261. PMID: 12484609
10. Schaefer K.S., Doughman Y.Q., Fisher S.A., Watanabe M. Dynamic patterns of apoptosis in the developing chicken heart. *Dev Dyn.* 2004; 229 (3): 489–499. PMID: 14991705
11. Zeng B., Ren X.F., Cao F., Zhou X.Y., Zhang J. Developmental patterns and characteristics of epicardial cell markers Tbx18 and Wt1 in murine embryonic heart. *J Biomed Sci.* 2011; 18: 67. DOI: 10.1186/1423-0127-18-67. PMID: 21871065
12. Limana F., Bertolami C., Mangoni A., Di Carlo A., Avitabile D., Mocini D., Iannelli P., De Mori R., Marchetti C., Pozzoli O., Gentili C., Zacheo A., Germani A., Capogrossi M.C. Myocardial infarction induces embryonic reprogramming of epicardial c-kit (+) cells: role of the pericardial fluid. *J Mol Cell Cardiol.* 2010; 48 (4): 609–618. Epub 2009 Dec 5. DOI: 10.1016/j.jmcc.2009.11.008. PMID: 19968998
13. Huang G.N., Thatcher J.E., McAnally J., Kong Y., Qi X., Tan W., DiMaio J.M., Amatruda J.F., Gerard R.D., Hill J.A., Bassel-Duby R., Olson E.N. C/EBP transcription factors mediate epicardial activation during heart development and injury. *Science.* 2012; 338 (6114): 1599–1603. DOI: 10.1126/science.1229765. Epub 2012 Nov 15. PMID: 23160954 PMCID: PMC3613149
14. von Gise A., Pu W.T. Endocardial and epicardial epithelial to mesenchymal transitions in heart development and disease. *Circ Res.* 2012; 110 (12): 1628–1645. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.111.259960. Review. PMID: 22679138
15. Smits A.M., Riley P.R. Epicardium-Derived Heart Repair. *J Dev Biol.* 2014; 2 (2): 84–100. PMID: 27536554 PMCID: PMC4984950 DOI: 10.3390/jdb2020084
16. Zhou B., Honor L.B., He H., Ma Q., Oh J.H., Butterfield C., Lin R.Z., Melero-Martin J.M., Dolmatova E., Duffy H.S., Gise A., Zhou P., Hu

damaged zone, which may be an important factor for effective reparation.

Thus, transplantation of TES based on MSC sheets appears to be a promising approach for the effective delivery of viable cells to myocardium in order to activate the epicardial cellular niche and angiogenesis.

Acknowledgement.

The work was financially supported by the RSCF grant No. 19-15-00384.

References

1. Cao J., Poss K.D. The epicardium as a hub for heart regeneration. *Nat Rev Cardiol.* 2018; 15 (10): 631–647. DOI: 10.1038/s41569-018-0046-4.
2. Wei K., Serpooshan V., Hurtado C., Diez-Cuñado M., Zhao M., Maruyama S., Zhu W., Fajardo G., Nosedá M., Nakamura K., Tian X., Liu Q., Wang A., Matsuura Y., Bushway P., Cai W., Savchenko A., Mahmoudi M., Schneider M.D., van den Hoff M.J., Butte M.J., Yang P.C., Walsh K., Zhou B., Bernstein D., Mercola M., Ruiz-Lozano P. Epicardial FSTL1 reconstitution regenerates the adult mammalian heart. *Nature.* 2015; 525 (7570): 479–485. DOI: 10.1038/nature15372
3. Dergilev K.V., Tsokolayeva Z.I., Ryzhkov I.A., Parfyonova E.V. Transplantation of Cardiac Mesenchymal Progenitor Cell Sheets for Myocardial Vascularization after an Infarction (Experimental Study). *Obshchaya Reanimatologiya=General Reanimatology.* 2018; 14 (6): 28–40. [In Russ.] DOI: 10.15360/1813-9779-2018-6-28-40
4. Dergilev K.V., Tsokolayeva Z.I., Beloglazova I.B., Ratner E.I., Parfyonova E.V. Epicardial Transplantation of Cardiac Progenitor Cells Based Cells Sheets is More Promising Method for Stimulation of Myocardial Regeneration, Than Conventional Cell Injections. *Kardiologiya.* 2019; 59 (5): 53–60. DOI: 10.18087/cardio.2019.5.2597. PMID: 31131768
5. Dergilev K., Tsokolayeva Z., Makarevich P., Beloglazova I., Zubkova E., Boldyreva M., Ratner E., Dykanov D., Menshikov M., Ovchinnikov A., Ageev F., Parfyonova Y.C. Kit Cardiac Progenitor Cell Based Cell Sheet Improves Vascularization and Attenuates Cardiac Remodeling following Myocardial Infarction in Rats. *Biomed Res Int.* 2018 Jun 25; 2018: 3536854. DOI: 10.1155/2018/3536854. eCollection 2018. PMID: 30046593
6. Traktuev D.O., Tsokolayeva Z.I., Shevelev A.A., Talitskiy K.A., Stepanova V.V., Johnstone B.H., Rahmat-Zade T.M., Kapustin A.N., Tkachuk V.A., March K.L., Parfyonova Y.V. Urokinase gene transfer augments angiogenesis in ischemic skeletal and myocardial muscle. *Mol Ther.* 2007; 15 (11): 1939–1946. Epub 2007 Jul 24. PMID: 17653104
7. Gittenberger-de Groot A.C., Vrancken Peeters M.P., Bergwerff M., Mentink M.M., Poelmann R.E. Epicardial outgrowth inhibition leads to compensatory mesothelial outflow tract collar and abnormal cardiac septation and coronary formation. *Circ Res.* 2000; 87 (11): 969–971. PMID: 11090540 DOI: 10.1161/01.res.87.11.969
8. Pérez-Pomares J.M., Carmona R., González-Iriarte M., Atencia G., Wesels A., Muñoz-Chápuli R. Origin of coronary endothelial cells from epicardial mesothelium in avian embryos. *Int J Dev Biol.* 2002; 46 (8): 1005–1013. PMID: 12533024
9. Poelmann R.E., Lie-Venema H., Gittenberger-de Groot A.C. The role of the epicardium and neural crest as extracardiac contributors to coronary vascular development. *Tex Heart Inst J.* 2002; 29 (4): 255–261. PMID: 12484609
10. Schaefer K.S., Doughman Y.Q., Fisher S.A., Watanabe M. Dynamic patterns of apoptosis in the developing chicken heart. *Dev Dyn.* 2004; 229 (3): 489–499. PMID: 14991705
11. Zeng B., Ren X.F., Cao F., Zhou X.Y., Zhang J. Developmental patterns and characteristics of epicardial cell markers Tbx18 and Wt1 in murine embryonic heart. *J Biomed Sci.* 2011; 18: 67. DOI: 10.1186/1423-0127-18-67. PMID: 21871065
12. Limana F., Bertolami C., Mangoni A., Di Carlo A., Avitabile D., Mocini D., Iannelli P., De Mori R., Marchetti C., Pozzoli O., Gentili C., Zacheo A., Germani A., Capogrossi M.C. Myocardial infarction induces embryonic reprogramming of epicardial c-kit (+) cells: role of the pericardial fluid. *J Mol Cell Cardiol.* 2010; 48 (4): 609–618. Epub 2009 Dec 5. DOI: 10.1016/j.jmcc.2009.11.008. PMID: 19968998
13. Huang G.N., Thatcher J.E., McAnally J., Kong Y., Qi X., Tan W., DiMaio J.M., Amatruda J.F., Gerard R.D., Hill J.A., Bassel-Duby R., Olson E.N. C/EBP transcription factors mediate epicardial activation during heart development and injury. *Science.* 2012; 338 (6114): 1599–1603. DOI: 10.1126/science.1229765. Epub 2012 Nov 15. PMID: 23160954 PMCID: PMC3613149
14. von Gise A., Pu W.T. Endocardial and epicardial epithelial to mesenchymal transitions in heart development and disease. *Circ Res.* 2012; 110 (12): 1628–1645. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.111.259960. Review. PMID: 22679138
15. Smits A.M., Riley P.R. Epicardium-Derived Heart Repair. *J Dev Biol.* 2014; 2 (2): 84–100. PMID: 27536554 PMCID: PMC4984950 DOI: 10.3390/jdb2020084
16. Zhou B., Honor L.B., He H., Ma Q., Oh J.H., Butterfield C., Lin R.Z., Melero-Martin J.M., Dolmatova E., Duffy H.S., Gise A., Zhou P., Hu

- Y.W., Wang G., Zhang B., Wang L., Hall J.L., Moses M.A., McGowan F.X., Pu W.T. Adult mouse epicardium modulates myocardial injury by secreting paracrine factors. *J Clin Invest.* 2011; 121 (5): 1894–1904. DOI: 10.1172/JCI45529. Epub 2011 Apr 18. PMID: 21505261 PMCID: PMC3083761 DOI: 10.1172/JCI45529
17. van Wijk B., Gunst Q.D., Moorman A.F., van den Hoff M.J. Cardiac regeneration from activated epicardium. *PLoS One.* 2012; 7 (9): e44692. DOI: 10.1371/journal.pone.0044692. Epub 2012 Sep 20. PMID: 23028582 PMCID: PMC3447884
 18. Smart N., Bollini S., Dubé K.N., Vieira J.M., Zhou B., Riegler J., Price A.N., Lythgoe M.F., Davidson S., Yellon D., Pu W.T., Riley P.R. Myocardial regeneration: expanding the repertoire of thymosin $\beta 4$ in the ischemic heart. *Ann NY Acad Sci.* 2012; 1269: 92–101. PMID: 23045976 PMCID: PMC4084412 DOI: 10.1111/j.1749-6632.2012.06708.x
 19. Zangi L., Lui K.O., von Gise A., Ma Q., Ebina W., Ptaszek L.M., Später D., Xu H., Tabebordbar M., Gorbato R., Sena B., Nahrendorf M., Briscoe D.M., Li R.A., Wagers A.J., Rossi D.J., Pu W.T., Chien K.R. Modified mRNA directs the fate of heart progenitor cells and induces vascular regeneration after myocardial infarction. *Nat Biotechnol.* 2013; 31 (10): 898–907. Epub 2013 Sep 8. PMID: 24013197 PMCID: PMC4058317 DOI: 10.1038/nbt.2682
 20. Smart N., Dubé K.N., Riley P.R. Identification of Thymosin $\beta 4$ as an effector of Hand1-mediated vascular development. *Nat Commun.* 2010; 1: 46. PMID: 20975697 PMCID: PMC2963826 DOI: 10.1038/ncomms1041
 21. Zhou B.L., Pu W.T. Epicardial epithelial-to-mesenchymal transition in injured heart. *J Cell Mol Med.* 2011; 15 (12): 2781–2783. PMID: 21914126 PMCID: PMC3226901 DOI: 10.1111/j.1582-4934.2011.01450.x
 22. Russell J.L., Goetsch S.C., Gaiano N.R., Hill J.A., Olson E.N., Schneider J.W. A dynamic notch injury response activates epicardium and contributes to fibrosis repair. *Circ Res.* 2011; 108 (1): 51–59. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.110.233262. Epub 2010 Nov 24. PMID: 21106942
 23. Winter E.M., Gittenberger-de Groot A.C. Epicardium-derived cells in cardiogenesis and cardiac regeneration. *Cell Mol Life Sci.* 2007; 64 (6): 692–703. Review. PMID: 17380310
 24. Limana F., Zacheo A., Mocini D., Mangoni A., Borsellino G., Diamantini A., De Mori R., Battistini L., Vigna E., Santini M., Loiaconi V., Pompilio G., Germani A., Capogrossi M.C. Identification of myocardial and vascular precursor cells in human and mouse epicardium. *Circ Res.* 2007; 101 (12): 1255–1265. Epub 2007 Oct 18. PMID: 17947800
 25. Zubkova E.S., Beloglazova I.B., Makarevich P.I., Boldyreva M.A., Sukhareva O.Y., Shestakova M.V., Dergilev K.V., Parfyonova Y.V., Men'shikov M.Y. Regulation of Adipose Tissue Stem Cells Angiogenic Potential by Tumor Necrosis Factor-Alpha. *J Cell Biochem.* 2016; 117 (1): 180–196. DOI: 10.1002/jcb.25263. PMID: 26096299
 26. Hong S.J., Traktuev D.O., March K.L. Therapeutic potential of adipose-derived stem cells in vascular growth and tissue repair. *Curr Opin Organ Transplant.* 2010; 15 (1): 86–91. DOI: 10.1097/MOT.0b013e328334f074 PMID: 19949335
 27. Saifi O., Ghandour B., Jaalouk D., Refaat M., Mahfouz R. Myocardial regeneration: role of epicardium and implicated genes. *Mol Biol Rep.* 2019. DOI: 10.1007/s11033-019-05075-0. PMID: 31549371
 28. Bargehr J., Ong L.P., Colzani M., Davaapil H., Hofsteen P., Bhandari S., Gambardella L., Le Novère N., Iyer D., Sampaziotis F., Weinberger F., Bertero A., Leonard A., Bernard W.G., Martinson A., Figg N., Regnier M., Bennett M.R., Murry C.E., Sinha S. Epicardial cells derived from human embryonic stem cells augment cardiomyocyte-driven heart regeneration. *Nat Biotechnol.* 2019 Aug; 37 (8): 895–906. Epub 2019 Aug 2. PMID: 31375810 DOI: 10.1038/s41587-019-0197-9
 29. Wang S., Huang S., Gong L., Yuan Z., Wong J., Lee J., Si M.S. Human Neonatal Thymus Mesenchymal Stem Cells Promote Neovascularization and Cardiac Regeneration. *Stem Cells Int.* 2018; 2018: 8503468. DOI: 10.1155/2018/8503468. eCollection 2018 PMID: 30305821
 30. Rehman J., Traktuev D., Li J., Merfeld-Clauss S., Temm-Grove C.J., Bovenkerk J.E., Pell C.L., Johnstone B.H., Considine R.V., March K.L. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation.* 2004; 109 (10): 1292–1298. Epub 2004; DOI: 10.1161/01.CIR.0000121425.42966.F1 PMID: 14993122
 31. Shevchenko E.K., Dergilev K.V., Tsokolaeva Z.I., Beloglazova I.B., Molokotina Y.D., Parfenova E.V., Men'shikov M.Y. Combination of Mesenchymal Stromal Cells and Cardiac Stem Cells in a Multilayer Cell Construct Promotes Activation of Notch Signaling and Initiation of Endothelial Differentiation. *Bull Exp Biol Med.* 2019; 166 (4): 548–552. DOI: 10.1007/s10517-019-04390-7. Epub 2019 Feb 19. PMID: 30783844
 32. Russell J.L., Goetsch S.C., Aguilar H.R., Frantz D.E., Schneider J.W. Targeting native adult heart progenitors with cardiogenic small molecules. *ACS Chem Biol.* 2012; 7 (6): 1067–1076. DOI: 10.1021/cb200525q. Epub 2012 Apr 13. PMID: 22413910
 33. del Monte G., Casanova J.C., Guadix J.A., MacGrogan D., Burch J.B., Pérez-Pomares J.M., de la Pompa J.L. Differential Notch signaling in the epicardium is required for cardiac inflow development and coronary vessel morphogenesis. *Circ Res.* 2011; 108 (7): 824–836. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.110.229062. Epub 2011 Feb 10. PMID: 21311046
 34. Grieskamp T., Rudat C., Lüdtke T.H., Norden J., Kispert A. Notch signaling regulates smooth muscle differentiation of epicardium-derived cells. *Circ Res.* 2011; 108 (7): 813–823. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.110.228809. Epub 2011 Jan 20. PMID: 21252157
 - Y.W., Wang G., Zhang B., Wang L., Hall J.L., Moses M.A., McGowan F.X., Pu W.T. Adult mouse epicardium modulates myocardial injury by secreting paracrine factors. *J Clin Invest.* 2011; 121 (5): 1894–1904. DOI: 10.1172/JCI45529. Epub 2011 Apr 18. PMID: 21505261 PMCID: PMC3083761 DOI: 10.1172/JCI45529
 17. van Wijk B., Gunst Q.D., Moorman A.F., van den Hoff M.J. Cardiac regeneration from activated epicardium. *PLoS One.* 2012; 7 (9): e44692. DOI: 10.1371/journal.pone.0044692. Epub 2012 Sep 20. PMID: 23028582 PMCID: PMC3447884
 18. Smart N., Bollini S., Dubé K.N., Vieira J.M., Zhou B., Riegler J., Price A.N., Lythgoe M.F., Davidson S., Yellon D., Pu W.T., Riley P.R. Myocardial regeneration: expanding the repertoire of thymosin $\beta 4$ in the ischemic heart. *Ann NY Acad Sci.* 2012; 1269: 92–101. PMID: 23045976 PMCID: PMC4084412 DOI: 10.1111/j.1749-6632.2012.06708.x
 19. Zangi L., Lui K.O., von Gise A., Ma Q., Ebina W., Ptaszek L.M., Später D., Xu H., Tabebordbar M., Gorbato R., Sena B., Nahrendorf M., Briscoe D.M., Li R.A., Wagers A.J., Rossi D.J., Pu W.T., Chien K.R. Modified mRNA directs the fate of heart progenitor cells and induces vascular regeneration after myocardial infarction. *Nat Biotechnol.* 2013; 31 (10): 898–907. Epub 2013 Sep 8. PMID: 24013197 PMCID: PMC4058317 DOI: 10.1038/nbt.2682
 20. Smart N., Dubé K.N., Riley P.R. Identification of Thymosin $\beta 4$ as an effector of Hand1-mediated vascular development. *Nat Commun.* 2010; 1: 46. PMID: 20975697 PMCID: PMC2963826 DOI: 10.1038/ncomms1041
 21. Zhou B.L., Pu W.T. Epicardial epithelial-to-mesenchymal transition in injured heart. *J Cell Mol Med.* 2011; 15 (12): 2781–2783. PMID: 21914126 PMCID: PMC3226901 DOI: 10.1111/j.1582-4934.2011.01450.x
 22. Russell J.L., Goetsch S.C., Gaiano N.R., Hill J.A., Olson E.N., Schneider J.W. A dynamic notch injury response activates epicardium and contributes to fibrosis repair. *Circ Res.* 2011; 108 (1): 51–59. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.110.233262. Epub 2010 Nov 24. PMID: 21106942
 23. Winter E.M., Gittenberger-de Groot A.C. Epicardium-derived cells in cardiogenesis and cardiac regeneration. *Cell Mol Life Sci.* 2007; 64 (6): 692–703. Review. PMID: 17380310
 24. Limana F., Zacheo A., Mocini D., Mangoni A., Borsellino G., Diamantini A., De Mori R., Battistini L., Vigna E., Santini M., Loiaconi V., Pompilio G., Germani A., Capogrossi M.C. Identification of myocardial and vascular precursor cells in human and mouse epicardium. *Circ Res.* 2007; 101 (12): 1255–1265. Epub 2007 Oct 18. PMID: 17947800
 25. Zubkova E.S., Beloglazova I.B., Makarevich P.I., Boldyreva M.A., Sukhareva O.Y., Shestakova M.V., Dergilev K.V., Parfyonova Y.V., Men'shikov M.Y. Regulation of Adipose Tissue Stem Cells Angiogenic Potential by Tumor Necrosis Factor-Alpha. *J Cell Biochem.* 2016; 117 (1): 180–196. DOI: 10.1002/jcb.25263. PMID: 26096299
 26. Hong S.J., Traktuev D.O., March K.L. Therapeutic potential of adipose-derived stem cells in vascular growth and tissue repair. *Curr Opin Organ Transplant.* 2010; 15 (1): 86–91. DOI: 10.1097/MOT.0b013e328334f074 PMID: 19949335
 27. Saifi O., Ghandour B., Jaalouk D., Refaat M., Mahfouz R. Myocardial regeneration: role of epicardium and implicated genes. *Mol Biol Rep.* 2019. DOI: 10.1007/s11033-019-05075-0. PMID: 31549371
 28. Bargehr J., Ong L.P., Colzani M., Davaapil H., Hofsteen P., Bhandari S., Gambardella L., Le Novère N., Iyer D., Sampaziotis F., Weinberger F., Bertero A., Leonard A., Bernard W.G., Martinson A., Figg N., Regnier M., Bennett M.R., Murry C.E., Sinha S. Epicardial cells derived from human embryonic stem cells augment cardiomyocyte-driven heart regeneration. *Nat Biotechnol.* 2019 Aug; 37 (8): 895–906. Epub 2019 Aug 2. PMID: 31375810 DOI: 10.1038/s41587-019-0197-9
 29. Wang S., Huang S., Gong L., Yuan Z., Wong J., Lee J., Si M.S. Human Neonatal Thymus Mesenchymal Stem Cells Promote Neovascularization and Cardiac Regeneration. *Stem Cells Int.* 2018; 2018: 8503468. DOI: 10.1155/2018/8503468. eCollection 2018 PMID: 30305821
 30. Rehman J., Traktuev D., Li J., Merfeld-Clauss S., Temm-Grove C.J., Bovenkerk J.E., Pell C.L., Johnstone B.H., Considine R.V., March K.L. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation.* 2004; 109 (10): 1292–1298. Epub 2004; DOI: 10.1161/01.CIR.0000121425.42966.F1 PMID: 14993122
 31. Shevchenko E.K., Dergilev K.V., Tsokolaeva Z.I., Beloglazova I.B., Molokotina Y.D., Parfenova E.V., Men'shikov M.Y. Combination of Mesenchymal Stromal Cells and Cardiac Stem Cells in a Multilayer Cell Construct Promotes Activation of Notch Signaling and Initiation of Endothelial Differentiation. *Bull Exp Biol Med.* 2019; 166 (4): 548–552. DOI: 10.1007/s10517-019-04390-7. Epub 2019 Feb 19. PMID: 30783844
 32. Russell J.L., Goetsch S.C., Aguilar H.R., Frantz D.E., Schneider J.W. Targeting native adult heart progenitors with cardiogenic small molecules. *ACS Chem Biol.* 2012; 7 (6): 1067–1076. DOI: 10.1021/cb200525q. Epub 2012 Apr 13. PMID: 22413910
 33. del Monte G., Casanova J.C., Guadix J.A., MacGrogan D., Burch J.B., Pérez-Pomares J.M., de la Pompa J.L. Differential Notch signaling in the epicardium is required for cardiac inflow development and coronary vessel morphogenesis. *Circ Res.* 2011; 108 (7): 824–836. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.110.229062. Epub 2011 Feb 10. PMID: 21311046
 34. Grieskamp T., Rudat C., Lüdtke T.H., Norden J., Kispert A. Notch signaling regulates smooth muscle differentiation of epicardium-derived cells. *Circ Res.* 2011; 108 (7): 813–823. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.110.228809. Epub 2011 Jan 20. PMID: 21252157

Поступила 28.10.19

Received 28.10.19

Лазер-индуцированная флуоресцентная спектроскопия в диагностике тканевой гипоксии (обзор)

А. С. Бабкина^{1,2}

¹ НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского ФНКЦ РР,
Россия, 107031, г. Москва, ул. Петровка, д. 25, стр. 2

² Российский университет дружбы народов,
Россия, 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

Laser-Induced Fluorescence Spectroscopy in the Diagnosis of Tissue Hypoxia (Review)

Anastasiya S. Babkina^{1,2}

¹ V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology,
Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitology,
25 Petrovka Str., Build. 2, 107031 Moscow, Russia

² Peoples' Friendship University of Russia,
6 Miklukho-Maclaya Str., 117198 Moscow, Russia

Цель обзора — анализ опыта диагностики тканевой гипоксии методом лазер-индуцированной спектроскопии, а также выявление перспективных направлений и потенциальных возможностей данного метода для дальнейшего его применения в экспериментальной и клинической медицине.

В обзоре представили данные исследований интенсивности флуоресценции эндогенных молекул-флуорофоров (никотинадениндинуклеотида восстановленного, флавинодениндинуклеотида окисленного) как маркеров ишемического повреждения внутренних органов (мозга, сердца, печени, почек и др.). Рассмотрели принципы метода флуоресцентной лазер-индуцированной спектроскопии *in vivo*. Уделили внимание историческим аспектам темы. Показали результаты применения метода в экспериментальных и клинических исследованиях тканевой гипоксии и ишемии. Выявили трудности в интерпретации значений интенсивности аутофлуоресцентного сигнала исследуемых молекул. Отметим, что неизвестным остается период сохранения способности ткани к аутофлуоресценции в условиях длительной аноксии, отсутствуют систематизированные представления о влиянии экзогенных и эндогенных факторов на интенсивность аутофлуоресценции.

Сделали вывод, что применение метода лазер-индуцированной флуоресцентной спектроскопии с целью диагностики тканевой ишемии является перспективным направлением в экспериментальной и клинической медицине, не исчерпавшим себя, и оставляющим ряд нерешенных вопросов, несмотря на большое количество исследований в данной области.

Ключевые слова: лазер-индуцированная флуоресценция; НАДН; ФАД; гипоксия; эндогенные флуорофоры; тканевая гипоксия; ишемия головного мозга

The aim of review is to discuss the results of studies on diagnosis of tissue hypoxia by laser-induced spectroscopy, as well as to identify promising trends and prospects of this technique for its further application in experimental and clinical medicine.

The review presents the findings of studies of the fluorescence intensity of endogenous fluorophore molecules (reduced nicotinamide adenine dinucleotide, oxidized flavin adenine dinucleotide) as markers of ischemic injury of internal organs (brain, heart, liver, kidneys, etc.). The principles of fluorescence laser-induced spectroscopy *in vivo* are discussed. The historical aspects of the subject are also covered. The results of the use of the technique in experimental and clinical studies of tissue hypoxia and ischemia are shown. Difficulties in interpreting the intensity values of autofluorescent signal of the studied molecules are revealed. It was noted that the tissue autofluorescence in a long-term anoxia remains unknown, and there are no structured ideas about the impact of exogenous and endogenous factors on autofluorescence intensity.

In conclusion, the use of laser-induced fluorescence spectroscopy to diagnose tissue ischemia is a promising area of experimental and clinical medicine, which still has various unresolved issues, despite a large number of studies in this domain.

Keywords: laser-induced fluorescence; NADH; FAD; hypoxia; endogenous fluorophores; tissue hypoxia; brain ischemia

DOI:10.15360/1813-9779-2019-6-50-61

Адресс для корреспонденции:

Анастасия С. Бабкина
E-mail: asbabkina@gmail.com

Correspondence to:

Anastasiya S. Babkina
E-mail: asbabkina@gmail.com

Введение

Вопрос устойчивости ткани к гипоксии и аноксии является фундаментальной темой в медицине, имеющей мультидисциплинарное значение. Кислородное голодание является причиной нарушения тканевого метаболизма при кровопотере, нарушениях кровообращения, травматических повреждениях, острых отравлениях и при других критических состояниях [1–3]. Изучение механизмов гипоксии/аноксии как патологического процесса и современных способов ее диагностики представляет интерес для врачей любой специальности. Преимущества диагностики тканевой гипоксии *in situ* в экспериментальных моделях, а также в клинической медицине, заключающиеся в возможности интраоперационного мониторинга состояния органов и тканей, определения жизнеспособности ткани при нарушении кровообращения, а также трансплантируемой ткани обуславливает необходимость уделить большее внимание методам, позволяющим в реальном времени, *in situ* диагностировать тканевую гипоксию. Одним из таких методов является лазер-индуцированная аутофлуоресцентная спектроскопия.

Цель обзора литературы — анализ опыта диагностики тканевой гипоксии методом лазер-индуцированной спектроскопии, а также выявление перспективных направлений и потенциальных возможностей данного метода для дальнейшего его применения в экспериментальной и клинической медицине.

Теоретические основы метода аутофлуоресцентной спектроскопии. Метод аутофлуоресцентной спектроскопии основан на регистрации интенсивности флуоресценции эндогенных молекул-флуорофоров. Явление аутофлуоресценции заключается в испускании квантов света возбужденными в результате воздействия излучения с определенной длиной волны молекулами при переходе из метастабильного состояния, с более высокого энергетического уровня, в основное состояние, с наименьшей энергией [4, 5].

Наиболее важными для диагностики эндогенными тканевыми флуорофорами являются триптофан, коллаген, эластин, восстановленный никотинамидадениндинуклеотид (НАДН), а также его фосфат (НАДФН), флавины и флавопротенины (ФАД, ФМН), порфирины, бета-каротин. Пиридиновые и флавиновые нуклеотиды, локализующиеся в большей степени в митохондриях и в меньшей — в цитоплазме, являются одним из основных источников клеточной флуоресценции [6]. Участие данных соединений в широком спектре внутриклеточных процессов, таких как гликолиз, пентозный цикл, цикл Кребса, окисление жирных кислот, работа дыха-

Introduction

Tissue resistance to hypoxia and anoxia is a fundamental topic in medicine of a multidisciplinary significance. Oxygen starvation is the cause of tissue metabolism disorders in case of blood loss, blood circulation disorders, traumatic injuries, acute poisoning and other critical conditions [1–3]. Studying the mechanisms of hypoxia/anoxia as a pathological process and modern methods of its diagnosis attracts the attention of clinicians of any specialty. *In-situ* diagnosis of tissue hypoxia in experimental models, as well as in clinical medicine, offers a possibility of intraoperative monitoring of organs and tissues, tissue viability determination in circulatory failure after transplantation. Therefore, it is necessary to place more emphasis on methods that allow to diagnose tissue hypoxia *in situ* in real time. One of such methods is laser-induced autofluorescence spectroscopy.

The aim of this literature review is to examine the available data on diagnosing the tissue hypoxia by laser-induced spectroscopy, as well as to identify the promising directions and prospects of this technique for its further application in experimental and clinical medicine.

Fundamentals of autofluorescence spectroscopy. Autofluorescence spectroscopy is based on the detection of fluorescence intensity of endogenous fluorophore molecules. The phenomenon of autofluorescence consists in emitting quanta of light by molecules excited due to the effects of radiation with a specific long wavelength, when changing from a metastable state with a higher energy level to the basic state with the lowest energy [4, 5].

The most important diagnostic endogenous tissue fluorophores are tryptophan, collagen, elastin, reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH), as well as its phosphate (NADPH), flavins and flavoproteins (FAD, FMN), porphyrins, beta-carotene. Pyridine and flavin nucleotides, which are located to a greater extent in mitochondria and to a lesser extent in cytoplasm, are one of the main sources of cellular fluorescence [6]. They participate in a wide range of intracellular processes, such as glycolysis, pentose cycle, Krebs cycle, fatty acid oxidation, mitochondrial respiratory chain, and biosynthetic processes, and can be used as markers of cellular metabolism in normal and pathological processes [7–10]. The NADH coenzyme fluoresces only in the reduced form and the maximum excitation is registered on exposure to radiation with a wavelength of 340 nm, while the quantum fluorescence yield is greater if NADH is bound to the protein. Flavin nucleotides are only capable of fluorescence in oxidized form. The maximum excitation is registered on exposure to radiation with a wavelength of 450 nm [5, 7]. Based on

тельной цепи митохондрий, биосинтетические процессы, обуславливает возможность использования их в качестве маркеров клеточного метаболизма в норме и при патологических процессах [7–10]. Кофермент НАДН флуоресцирует только в восстановленной форме и максимум возбуждения регистрируется при воздействии излучения с длиной волны 340 нм, при этом квантовый выход флуоресценции больше, если НАДН связан с белком. Флавиновые нуклеотиды способны к флуоресценции только в окисленной форме. Максимум возбуждения регистрируется при воздействии излучения с длиной волны 450 нм. [5, 7] На основании различного квантового выхода этих коферментов в их окисленной и восстановленной формах может быть осуществлен мониторинг клеточно-го и тканевого метаболизма [10–18].

История метода. С момента открытия оптических свойств восстановленного никотинамидадениндинуклеотида в 1950 году началось интенсивное исследование его как маркера митохондриальных функций. Основоположник данного направления Бриттон Чанс в результате своих многочисленных исследований как *in vitro*, так и *in vivo* доказал, что митохондриальная функция может быть оценена по редокс-состоянию НАДН. Основной вехой в истории исследования коферментов стало создание в 1954 году Б. Чансом двухлучевого спектрофотометра [19]. Спектрофотометрическим методом были впервые изучены метаболические состояния изолированных митохондрий в зависимости от субстрата, кислорода и уровня АДФ. В 1959 году Chance и Legallais разработали дифференциальный микрофлуориметр, что позволило исследовать коферменты не только в клеточных суспензиях, ультратонких образцах тканей, но и в тканях животных *in vivo*. В 1962 года появляются первые работы Chance et al., в которых мониторинг НАДН проводился органах анестезированных крыс.

В 1971 году Jobsis и соавт. впервые применил данный метод на мозге нейрохирургических пациентов с фокальной эпилепсией *in vivo*. Была выявлена корреляция показателей НАДН с данными электрокортикографии при прямой кортикальной стимуляции контролируемой области. Полученные результаты оказались схожими с результатами предшествующего аналогичного экспериментального исследования [20].

Из-за трудностей интерпретации аутофлуоресценции ткани использование метода флуоресцентной спектроскопии получило широкое распространение в медицине только с использованием экзогенных флуорофоров. Однако, интерес к аутофлуоресцентной спектроскопии тканей *in vivo* доказан множеством работ, начиная с исследований Б. Чанса и соавт.

the different quantum yield of these coenzymes in oxidized and reduced forms, cellular and tissue metabolism can be monitored [10–18].

History of the method. Since the discovery of the optical properties of the reduced nicotinamide adenine dinucleotide in 1950, it has been intensively studied as a marker of mitochondrial function. The founder of this area of research, Britton Chance, has proven through his numerous studies, both *in vitro* and *in vivo*, that mitochondrial function can be evaluated by the redox state of NADH. A major milestone in the history of coenzyme research was the creation of a two-beam spectrophotometer by B. Chance in 1954 [19]. Metabolic characteristics of isolated mitochondria as a function of substrate, oxygen and ADP level were studied for the first time by a spectrophotometry. In 1959, Chance and Legallais developed a differential microfluorimeter for studying coenzymes not only in cell suspensions and ultra-thin tissue samples, but also in animal tissues *in vivo*. In 1962, the first works by Chance et al. appeared, where monitoring of NADH was done on anesthetized rat organs.

In 1971, Jobsis et al. pioneered this method in the brain of neurosurgical patients with focal epilepsy *in vivo*. A correlation between NADH and electrocorticography data was found in direct cortical stimulation of the controlled areas. The obtained results were consistent with those of a previous similar experimental study [20].

Due to difficulties in interpreting the tissue autofluorescence, the use of fluorescence spectroscopy has become widespread in medicine only with the introduction of exogenous fluorophores. However, the interest in autofluorescence spectroscopy of tissues *in vivo* has been demonstrated by a number of studies ranging from the works of B. Chance et al. to modern Russian and foreign research dealing with the role of tissue autofluorescence in malignant neoplasms, neurodegenerative diseases, ischemia and reperfusion [21].

Diagnosing the ischaemic injury of internal organs by laser-induced fluorescence spectroscopy. The cells switch to anaerobic respiration as a result of hypoxia. Changes in the respiratory enzyme chain are initialized at the NADH-dependent site with a short-term increase in functioning, followed by suppression of this mitochondrial complex site. Lack of oxygen leads to the accumulation of reduced nicotinamide coenzyme (NADH), fluorescing in ultraviolet light, which makes it possible to use NADH as a marker of mitochondrial dysfunction caused by hypoxia/anoxia. Autofluorescence fading is observed with continued anoxia [22–24].

Since the problem of tissue viability assessment in the context of ischemia has remained to this day, it is still relevant to use techniques to determine the condition of cells in the ischemic area without special preparation of the tissue sample

и, заканчивая современными отечественными и зарубежными публикациями, посвященными изучению тканевой ауофлуоресценции в злокачественных новообразованиях, при нейродегенеративных заболеваниях, при ишемии и реперфузии [21].

Диагностика ишемического повреждения внутренних органов методом лазериндуцированной флуоресцентной спектроскопии. Следствием гипоксии является переход клеток на анаэробное дыхание. Изменение в цепи дыхательных ферментов инициализируется на НАДН-зависимом участке, что выражается в кратковременном усилении, а затем подавлением работы этого участка митохондриального комплекса. Отсутствие кислорода приводит к накоплению восстановленного никотинамидного кофермента (НАДН), флуоресцирующего в ультрафиолетовом свете, что позволяет использовать НАДН в качестве маркера митохондриальных дисфункций, вызванных гипоксией/аноксией. В условиях продолжающейся аноксии наблюдается угасание аутофлуоресценции [22–24].

Так как проблема оценки жизнеспособности тканей на фоне ишемии существует по сей день, сохраняется актуальность применения методов, позволяющих определить состояние клеток ишемизированного участка без специальной подготовки образца ткани и в режиме реального времени. К настоящему времени проведен ряд экспериментальных и клинических исследований по использованию лазериндуцированной флуоресцентной спектроскопии в нейро- и кардиохирургии, онкологии, гастроэнтерологии [25–30].

В самом начале внедрения метода в экспериментальную медицину С. Н. Barlow (1977) были проведены исследования флуоресценции НАДН в миокарде при коронарной окклюзии, в результате которых были выявлены изменения уже через 15 секунд от момента наложения лигатуры на коронарную артерию. В исследовании F. H. Tomlinson было обнаружено, что ишемия мозга сопровождается увеличением флуоресценции НАДН на 150% через 15 минут после окклюзии сонной артерии [31].

Fitzgerald J. T. и соавт. показали в эксперименте эффективность лазерной аутофлуоресцентной визуализации в диагностике ишемического и реперфузионного повреждения почек *in vivo* и оценке их жизнеспособности после периода окклюзии почечных артерий [32]. Tirapelli L. F. и соавт. успешно использовали метод аутофлуоресцентной спектроскопии для исследования их реакции на длительную ишемию и реперфузию в эксперименте, а также выявили связь между интенсивностью флуоресценции почек при ишемическом и

and in real time. To date, a number of experimental and clinical studies on the use of laser-induced fluorescence spectroscopy in neuro- and cardiac surgery, oncology, gastroenterology has been carried out [25–30].

In the early days of the method implementation in experimental medicine, C. H. Barlow (1977) studied the fluorescence of NADH in myocardium during coronary occlusion and identified its changes after 15 seconds from the moment of coronary artery ligation. In the study by F. H. Tomlinson, brain ischemia was associated with a 150% increase in NADH fluorescence 15 minutes after carotid occlusion [31].

Fitzgerald J. T. et al. showed in their experiment the efficacy of laser autofluorescent imaging in the diagnosis of ischemic and reperfusion damage of the kidneys *in vivo* and assessment of their viability after a period of renal artery occlusion [32]. Tirapelli L. F. et al. successfully used autofluorescence spectroscopy to study the response to long-term ischemia and reperfusion in the experiment, and also found a correlation between the intensity of renal fluorescence in ischemic and reperfusion damage and histological signs of renal, as well as mitochondrial damage [33, 34]. Raman R. N. et al. suggested using multimodal autofluorescence spectroscopy to predict the post-transplantation kidney function [35].

The study of NAD(F)H and FAD as autofluorescent biomarkers of metabolic disturbances and liver and hepatocyte damage began in the 1950s. The purpose of later studies was to monitor the liver response to ischemia/reperfusion. Subsequently, fluorescent fatty acids, lipopigments, and collagen were characterized as optical biomarkers of liver steatosis and fibrosis [36, 37].

M. F. Lacour et al. demonstrated a correlation between the redox ratio (NADH/FAD) and other markers of hepatic injury on a 60-minute and 90-minute liver ischemia model with and without reperfusion [38].

Croce A. C. et al. studied the autofluorescence properties of bile and concluded that autofluorescence bile spectroscopy can provide additional information to assess changes in the liver metabolic activity balance [39].

Arutyunyan A. V. et al. demonstrated in an experiment the high efficacy of intraoperative use of the laser-induced fluorescence spectroscopy method for diagnostics of pancreas tissue necrosis *in situ* at acute pancreatitis [40].

Smelt M. J. et al. suggested using fluorescence of NADH and FAD coenzymes of pancreatic beta cells to determine their viability before transplantation [41].

M. V. Shinkin et al. have shown a high diagnostic significance of the laser-induced spectroscopy method in combination with laser doppler fluom-

реперфузионном повреждении с морфологическими признаками повреждения почки, а также с повреждением митохондрий [33, 34]. Raman R. N. и соавт. предложили использовать мультимодальную аутофлуоресцентную спектроскопию для прогнозирования посттрансплационной функции почек [35].

Изучение НАД(Ф)Н и ФАД в качестве аутофлуоресцентных биомаркеров нарушения метаболизма и повреждений печени и гепатитов началось с 1950-х годов. Целью более поздних исследований стал мониторинг реакции печени на ишемию/реперфузию. Впоследствии, флуоресцентные жирные кислоты, липопигменты и коллаген были охарактеризованы как оптические биомаркеры стеатоза печени, фиброза [36, 37].

М. F. La soug и соавт. на модели печеночной ишемии продолжительностью 60 и 90 минут с реперфузией и без нее выявили корреляцию редокс-отношения (НАДН/ФАД) с другими маркерами печеночного повреждения [38].

Сгосе А. С. и соавт. провели исследование аутофлуоресцентных свойств желчи и пришли к выводу, что аутофлуоресцентная спектроскопия желчи может предоставить дополнительную информацию для оценки изменений баланса метаболической активности печени [39].

Арутюнян А. В. и соавт. в эксперименте была продемонстрирована высокая эффективность интраоперационного использования метода лазерно-индуцированной флуоресцентной спектроскопии для диагностики некроза ткани поджелудочной железы *in situ* при остром панкреатите [40].

Smelt M. J. и соавт. предложили использовать флуоресценцию коферментов НАДН и ФАД бета-клеток поджелудочной железы для определения их жизнеспособности перед трансплантацией [41].

Шинкин М. В. и соавт. показали высокую диагностическую значимость метода лазерно-индуцированной спектроскопии в сочетании с ЛДФ в отношении раннего выявления нарушений тканевого метаболизма и оценки риска развития синдрома диабетической стопы у больных сахарным диабетом второго типа [42].

Staniszewski K. и соавт. было проведено исследование интенсивности флуоресценции НАДН и ФАД изолированных перфузированных легких крыс при добавлении в перфузат ингибитора митохондриального комплекса I (НАДН-убихинон-оксидоредуктазы) — ротенона, ингибитора комплекса IV (цитохром С-оксидазы) — цианида калия и разобщителя тканевого дыхания — пентахлорфенола. Изменения метаболического состояния митохондрий в легких отражались на показателях интенсивности флуоресценции коферментов.

etry for the early detection of tissue metabolic disorders and the assessment of the risk of diabetic foot syndrome in patients with type 2 diabetes mellitus [42].

Staniszewski K. et al. studied the intensity of NADH and FAD fluorescence of isolated perfused rat lungs after adding rotenon, mitochondrial complex I (NADH-ubiquinone-oxidoreductase) inhibitor; potassium cyanide, complex IV inhibitor (C-oxidase cytochrome), and pentachlorophenol, tissue respiration inhibitor, into the perfusate. Changes in the metabolic state of mitochondria in the lungs affected the intensity of coenzyme fluorescence. The autofluorescence signal decreased after adding blood to the perfusate, but the redox ratio remained unchanged. This study demonstrated the sensitivity of coenzyme fluorescence intensity and redox ratio to changes in redox processes in mitochondria [43].

Diagnosis of cerebral ischemia. The diagnostic significance of brain autofluorescence became apparent from the findings of B. Chance's early studies. The first use of laser-induced fluorescence spectroscopy *in vivo* in the clinic was carried out on neurosurgical patients for a reason [20]. A number of studies have shown a correlation between changes in the fluorescence signals of the reduced NADH and the oxidized FAD and the functional activity of neuronal and glial mitochondria, intracellular concentration of calcium and its transmembrane transport of calcium in mitochondria [44–47].

Despite the experimentally and clinically proven applicability of the fluorescence intensity indexes of NADH and FAD coenzymes as biomarkers of ischemic brain damage [48–55], the method has some limitations associated with the difficulty of data interpretation. In the *in vitro* study, Kahraman S. et al. demonstrated differences in the fluorescence mechanisms of pyridine nucleotides in neural and glial cells. Persisting anoxia after the initial increase in NADH fluorescence in neurons was accompanied by its gradual decrease, which was not observed in astrocytes. There is also a need to differentiate the changes in the autofluorescence of NAD(P)H caused by metabolic disorders from the changes induced by the stimulation of local blood flow by the increased lactate production during ischemia [56].

Polesskaya O. et al. developed a technique based on the relationship between the intensity of endogenous fluorescence of NADH and partial oxygen pressure in the tissue, allowing to diagnose the microregional hypoxia of the murine cerebral cortex [57].

In the light of several studies, the NADH and FAD autofluorescence intensity indices serve as markers not only for hypoxic brain damage, but also for neoplastic and neurodegenerative processes. In 2017, Shi L. et al. in experimental studies showed the possibility of using NADH, FAD and

При добавлении крови в перфузат аутофлуоресцентный сигнал снижался, но редокс-отношение оставалось неизменным. Это исследование продемонстрировало чувствительность показателей интенсивности флуоресценции коферментов и редокс-отношения к изменениям окислительно-восстановительных процессов в митохондриях [43].

Диагностика ишемии головного мозга.

Диагностическая значимость аутофлуоресценции головного мозга стала очевидной из результатов первых работ Б. Чанса. Не случайно первое применение метода лазер-индуцированной флуоресцентной спектроскопии *in vivo* в клинике было осуществлено на нейрохирургических пациентах [20]. В ряде исследований была показана взаимосвязь динамических изменений флуоресцентных сигналов восстановленной формы НАДН и окисленной формы ФАД с функциональной активностью митохондрий нейронов и глии, внутриклеточной концентрацией и процессами трансмембранного транспорта кальция в митохондриях [44–47].

Несмотря на доказанную экспериментальными и клиническими исследованиями возможность использования показателей интенсивности флуоресценции коферментов НАДН и ФАД в качестве биомаркеров ишемического повреждения головного мозга [48–55], существуют ограничения метода, связанные с трудностью интерпретации данных. Kahraman S. и соавт. в исследовании *in vitro* были показаны различия механизмов флуоресценции пиридинных нуклеотидов в нейрональных и глиальных клетках. При продолжающейся аноксии после увеличения флуоресценции НАДН в нейронах наблюдалось ее постепенное снижение, чего не было отмечено в астроцитах. А также возникает необходимость дифференцировать изменения аутофлуоресценции НАД(Ф)Н, вызванные нарушением метаболизма, с изменениями, спровоцированными стимуляцией локального кровотока увеличением продукции лактата при ишемии [56].

Polesskaya O. и соавт. был разработан метод, основанный на взаимосвязи между интенсивностью эндогенной флуоресценции НАДН и парциальным давлением кислорода в ткани, который позволил диагностировать микрорегиональную гипоксию коры головного мозга мыши [57].

Исходя из ряда исследований показатели интенсивности аутофлуоресценции НАДН и ФАД являются маркерами не только гипоксического повреждения головного мозга, но и опухолевых, а также нейродегенеративных процессов. В 2017 г Shi L. и соавт. в экспериментальном исследовании показали возможность использования аутофлуоресценции НАДН,

tryptophan autofluorescence for early diagnosis of Alzheimer's disease [58].

Pascu A. et al. have demonstrated that the comparative assessment of autofluorescence ranges of normal and neoplastic tissue helps to identify them.

The results of the experimental *in vitro* study led the authors to suggest using the fluorescence spectroscopy for the real-time assessment of neoplastic and adjacent normal tissue autofluorescence during surgery *in vivo* [59]. Zhu M. B. et al. supplemented the autofluorescence spectroscopy with optical coherence tomography, which increased the sensitivity of the tumor tissue identification from 86.1 to 95.9% [60].

Ibrahim B. A. et al. showed the effect of temperature on the fluorescence of NADH and FAD coenzymes in the rat cortex. An association between an increase in temperature and a decrease in FAD fluorescence was found [61].

A study by Reinert K. C. et al. showed that autofluorescence of cerebellar flavoproteins is related to inhibition and excitation processes [62].

The study of NADH and FAD coenzymes in ischemic brain damage not only proved the possibility of their use as damage and regeneration markers, but also gave rise to the development of drugs containing pyridine nucleotides which reduce the area of necrosis in the brain, improve the functional recovery, and reduce mortality in experimental animals after ischemic stroke [63].

Diagnosis of myocardial ischemia. Since autofluorescence spectroscopy of NADH and FAD coenzymes helps to evaluate tissue metabolism in real time, the use of this method for intraoperative cardiac monitoring is a promising aspect of clinical and experimental medicine.

Papayan G. et al. based on the results of studies of NADH and FAD coenzymes in ischemia-reperfusion of an isolated rat heart recommended this technique for intraoperative monitoring of myocardial metabolism during episodes of anoxia in patients who underwent cardiac surgery under cardiopulmonary bypass [64].

Lagarto J. L. et al. on the Langedorff isolated heart model revealed changes in FAD and NAD(P)H fluorescence associated with the glucose and oxygen depletion. Meanwhile, the coenzyme fluorescence intensity was more sensitive to changes in oxygen content in the perfusate than to changes in glucose level. The potential for using autofluorescence spectroscopy to estimate the content of type I collagen in the post-infarct period was demonstrated [65–67].

Despite the hypothetical background and the correlation between autofluorescence and rejection of the cardiac allograft found in experimental studies with rats, study on the use of laser-induced autofluorescence spectroscopy to assess the risk of

ФАД и триптофана для ранней диагностики болезни Альцгеймера [58].

Pascu A. и соавт. было продемонстрировано, что сравнение спектров аутофлуоресценции нормальной и опухолевой ткани головного мозга позволяет их идентифицировать. Результаты экспериментального исследования, проведенного *in vitro*, дало основание авторам высказать пожелание в дальнейшем использовать метод флуоресцентной спектроскопии для измерения аутофлуоресценции опухоли и прилегающей нормальной ткани *in vivo* в интраоперационных условиях в реальном времени [59]. Zhu M. B. соавт. дополнили аутофлуоресцентную спектроскопию оптической когерентной томографией, что увеличило чувствительность метода идентификации опухолевой ткани с 86,1 до 95,9% [60].

Ibrahim B. A. и соавт. было показано воздействие температуры на флуоресценцию коферментов НАДН и ФАД в коре головного мозга крыс. Была выявлена связь повышением температуры и снижением флуоресценции ФАД [61].

Исследование Reinert K.C. и соавт. показало взаимосвязь аутофлуоресценции флавопротеинов коры мозжечка с процессами торможения и возбуждения [62].

Изучение коферментов НАДН и ФАД при ишемическом повреждении головного мозга позволило не только доказать возможность их использования в качестве маркеров повреждения и регенерации, но и дать начало разработке препаратов, содержащих пиридиновые нуклеотиды, введение которых экспериментальным животным после ишемического инсульта снижает площадь некроза в головном мозге, улучшает функциональное восстановление и снижает смертность [63].

Диагностика ишемии миокарда. Так как аутофлуоресцентная спектроскопия коферментов НАДН и ФАД позволяет оценить тканевой метаболизм в режиме реального времени, использование данного метода с целью интраоперационного кардиомониторинга является перспективным направлением в клинической и экспериментальной медицине.

Papayan G. и соавт. в результате исследований коферментов НАДН, ФАД при ишемии-реперфузии изолированного сердца крысы рекомендовали данный метод для интраоперационного мониторинга метаболизма миокарда во время эпизодов аноксии у пациентов, перенесших кардиохирургическое вмешательство при искусственном кровообращении [64].

Lagarto J. L. и соавт. на модели изолированного сердца по Лангendorфу были выявлены изменения показателей флуоресценции ФАД и НАД(Ф)Н на фоне истощения глюкозы и кис-

cardiac transplant rejection done by Yamani M. et al. has not yielded positive results [68].

A number of papers deal with the use of this technique to control the condition of the myocardium in ischemia in cardioprotection. The study of NADH fluorescence changes in relation to the reperfusion period duration and type of cardioplegia conducted by T. Nishioka (1984) was among the earliest in this area. The incomplete recovery of coenzyme fluorescence level was explained by irreversible changes in myocardium [31]. Horvath et al. studied the changes of laser-induced NADH fluorescence in the myocardium during sequential occlusion and cold cardioprotection. Immediately after the occlusion, a rapid increase in the fluorescence of NADH was recorded over a period of less than 5 min, followed by a decline over the entire period of ischemia, which lasted for 2 hours. The FAD fluorescence patterns shown in this study was different: within 5 minutes after occlusion, there was a rapid decrease in fluorescence, followed by a slow decrease during 30 minutes, a steady level during 1 hour and a slow rise until the end of the study [69]. In a study by Aldakkak et al. (2009), the changes in NADH and FAD levels in myocardial ischemia induced by cardioplegia with hyperkalemic solution and lidocaine were evaluated. Different patterns of NADH changes with and without cardioplegia were demonstrated [70].

Camara A. K. and colleagues studied the cardioprotective effects of sevoflurane, warm reperfusion and hypothermia on the cold ischemia model in isolated guinea pig hearts, measuring metabolism using NADH and FAD levels. Ischemia caused a rapid increase in NADH and a decrease in FAD, which declined in 2 hours. Warm reperfusion resulted in a decrease in NADH and an increase in FAD. Sevoflurane attenuated changes in NADH and FAD and reduced the size of infarction [71].

Changes in the intensity of NADH and FAD autofluorescence in the myocardium during ischemia, reperfusion, in cardiomyopathy and cardioprotection found in a number of studies have made it possible to consider them as markers of myocardial ischemic injury [72–80].

Conclusion

The literature review shows that despite extensive research on this topic the interpretation of the auto-fluorescent signal intensity and the determination of the hypoxia/anoxia period are still open issues. Tissue autofluorescence has been studied quite well and explained theoretically only in the case of short-term ischemia. Studies on ischemia continuing for 60–90 minutes are rare, and they have provided no indication of tissue autofluorescence changes in complete lack of oxygen over the period of tissue death. Little attention has been

лорода. При этом интенсивность флуоресценции коферментов была более чувствительна к изменению содержания кислорода в перфузате, чем к изменению уровня глюкозы. Была показана возможность использования метода аутофлуоресцентной спектроскопии для оценки содержания коллагена I типа в постинфарктном периоде [65–67].

Несмотря на теоретические предпосылки и выявленную при проведении экспериментальных исследований на крысах корреляцию между аутофлуоресцентными показателями и отторжением аллотрансплантата сердца, использование лазер-индуцированной аутофлуоресцентной спектроскопии для оценки риска отторжения трансплантата сердца Yamani M. и соавт. не дало положительных результатов [68].

Ряд работ посвящен использованию рассматриваемого метода с целью контроля состояния миокарда при ишемии в условиях кардиопротекции. Исследование динамики флуоресценции НАДН в зависимости от длительности реперфузионного периода и типа кардиоплегии, проведенное Т. Nishioka (1984), явилось одним из первых в данном направлении. Неполное восстановление уровня флуоресценции коферментов было объяснено наличием необратимых изменений в миокарде [31]. Horvath и соавт. была изучена динамика лазер-индуцированной флуоресценции НАДН в тканях миокарда при последовательной окклюзии и холодовой кардиопротекции. Сразу после окклюзии был зарегистрирован быстрый рост флуоресценции НАДН за время менее 5 мин с последующим спадом в течение всего периода ишемии, составившего 2 часа. Динамика флуоресценции ФАД, приведенная в данной работе, имела другой характер: в течение 5 минут после окклюзии наблюдался быстрый спад флуоресценции, затем медленный спад в течение 30 мин, стационарный уровень в течение 1 ч и медленный подъем до окончания исследования [69]. Aldakkak et al. В 2009 оценили динамику изменения уровней НАДН и ФАД при ишемии миокарда при использовании кардиоплегии гиперкалемическим раствором и лидокаином. В результате были показаны отличия в динамике НАДН при использовании кардиоплегии и без таковой [70].

Samara A. K. и соавт. провели исследование кардиопротективного действия севофлюрана, теплой реперфузии и гипотермии на модели холодовой ишемии изолированных сердец морских свинок, контролируя метаболизм по показателям НАДН и ФАД. Ишемия вызвала быстрое увеличение НАДН и уменьшение ФАД, которое уменьшилось за 2 часа. Теплая реперфузия привела к снижению НАДН

paid to the impact of cytotoxic hypoxia on tissue autofluorescence. Studies in these areas could reveal in detail the mechanisms of autofluorescence and identify the patterns of its changes in the attenuated tissue metabolic processes after biological death, which is essential for intensive care, transplantation and forensic medicine.

Acknowledgments

The author would like to express her sincere gratitude to professor A. M. Golubev, MD, PhD, DSci (V. A. Negovsky Scientific Research Institute of General Reanimatology) for his help in writing this review and for his valuable comments.

и увеличению ФАД. Севофлюран ослаблял изменения НАДН и ФАД и уменьшал размер инфаркта [71].

Выявленные в исследованиях изменения показателей интенсивности аутофлуоресценции НАДН и ФАД в миокарде при ишемии, реперфузии, кардиомиопатиях, в условиях кардиопротекции позволяют рассматривать их в качестве маркеров ишемического повреждения миокарда [72–80].

Заключение

В результате проведенного обзора литературы можно утверждать, что несмотря на большое количество работ по данной теме, остаются открытыми вопросы интерпретации значений интенсивности аутофлуоресцентного сигнала, возможности определения периода гипоксии/аноксии. Аутофлуоресценция тканей достаточно хорошо изучена и объяснена теоретически только при кратковременной ишемии. Редко встречаются работы, в которых период ишемии достигал максимум 60–90 минут, но это не дает представления о том, как меняются аутофлуоресцентные свойства ткани при полном отсутствии кислорода с течением времени в процессе умирания ткани. Недостаточное внимание уделено изучению влияния цитотоксической гипоксии на аутофлуоресценцию тканей. Исследования по данным направлениям позволили бы не только подробно раскрыть механизмы явления аутофлуоресценции, но и выявить закономерности ее изменения при угасании метаболических процессов в тканях после биологической смерти, что имеет большое значение для реаниматологии, трансплантологии, судебной медицины.

Благодарность.

Автор искренне признателен д. м. н., профессору А. М. Голубеву (НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского ФНКИЦ РР) за помощь в написании обзора и сделанные ценные замечания.

Литература

1. Абрамова Е.А., Военнов О.В., Бояринов Г.А., Трофимов А.О. Церебральная циркуляция и метаболизм у пострадавших с черепно-мозговой травмой. *Общая реаниматология*. 2018; 14 (1): 4–11. DOI: 10.15360/1813-9779-2018-1-4-11
2. Рыжков И.А., Зарзешский Ю.В., Новодержкина И.С. Сравнительные аспекты регуляции кожной и мозговой микроциркуляции при острой кровопотере. *Общая реаниматология*. 2017; 13 (6): 18–27. DOI: 10.15360/1813-9779-2017-6-18-27
3. Бабкина А.С., Голубев А.М., Сундуков Д.В., Баширова А.Р., Голубев М.А. Клозапин: механизмы токсичности и побочных эффектов. *Общая реаниматология*. 2018; 14 (2): 35–45. DOI: 10.15360/1813-9779-2018-2-35-45
4. Рогаткин Д.А. Физические основы лазерной клинической флуоресцентной спектроскопии *in vivo*. *Медицинская физика* 2014; 4 (64): 78–96.
5. Векшин Н.Л. Флуоресцентная спектроскопия полимеров. Пути: Фотон-век; 2008. ISBN: 978-5-903789-07-8
6. Monici M. Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. *Biotechnol. Annu. Rev.* 2005; 11: 227–256. PMID: 16216779 DOI: 10.1016/S1387-2656 (05)11007-2
7. Лукина М.М., Ширманова М.В., Сергеева Т.Ф., Загайнова Е.В. Метаболический имиджинг в исследовании онкологических процессов (обзор). *Современные технологии в медицине* 2016; 8 (4): 113–128. DOI: 10.17691/stm2016.8.4.16
8. Danylovych H.V. Evaluation of functioning of mitochondrial electron transport chain with NADH and FAD autofluorescence. *Ukr. Biochem. J.* 2016; 88 (1): 31–43. PMID: 29227076 DOI: 10.15407/ubj88.01.031
9. Сясин Н.И., Борисова О.Н. Аутофлуоресценция, клеточное дыхание и современные возможности его неинвазивного исследования (обзор литературы). *Вестник новых медицинских технологий. Электронный журнал* 2014; 1. DOI 10.12737/3438
10. Bartolomé F., Abramov A.Y. Measurement of mitochondrial NADH and FAD autofluorescence in live cells. *Methods. Mol. Biol.* 2015; 1264: 263–720. PMID: 25631020 DOI: 10.1007/978-1-4939-2257-4_23
11. Blacker T.S., Duchon M.R. Investigating mitochondrial redox state using NADH and NADPH autofluorescence. *Free Radic. Biol. Med.* 2016; 100: 53–65. PMID: 27519271 DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.08.010
12. Danylovych H.V. Evaluation of functioning of mitochondrial electron transport chain with NADH and FAD autofluorescence. *Ukr. Biochem. J.* 2016; 88 (1): 31–43. PMID: 29227076 DOI: 10.15407/ubj88.01.031
13. Croce A.C., Bottiroli G. Autofluorescence Spectroscopy for Monitoring Metabolism in Animal Cells and Tissues. *Methods Mol. Biol.* 2017; 1560: 15–43. PMID: 28155143 DOI: 10.1007/978-1-4939-6788-9_2
14. Kolenc O.I., Quinn K.P. Evaluating Cell Metabolism Through Autofluorescence Imaging of NAD (P)H and FAD. *Antioxid. Redox Signal.* 2019; 30 (6): 875–889. PMID: 29268621 DOI: 10.1089/ars.2017.7451
15. Plettenberg H.K., Hoffmann M. Applications of autofluorescence for characterisation of biological systems (biomonitoring). *Biomed. Tech. (Berl.)*. 2002; 47 (2): 596–597. PMID: 12465247 DOI: 10.1515/bmte.2002.47.s1b.596
16. Chacko J.V., Eliceiri K.W. Autofluorescence lifetime imaging of cellular metabolism: Sensitivity toward cell density, pH, intracellular, and intercellular heterogeneity. *Cytometry A*. 2019; 95 (1): 56–69. PMID: 30296355 DOI: 10.1002/cyto.a.23603
17. Schaefer P.M., Kalinina S., Rueck A., von Arnim C.A.F., von Einem B. NADH Autofluorescence-A Marker on its Way to Boost Bioenergetic Research. *Cytometry A*. 2019; 95 (1): 34–46. PMID: 30211978 DOI: 10.1002/cyto.a.23597
18. Raghushaker C.R., Chandra S., Chakrabarty S., Kabekkodu S.P., Satyamoorthy K., Mahato K.K. Detection of mitochondrial dysfunction *in vitro* by laser-induced autofluorescence. *J. Biophotonics*. 2019; 28: e201900056. PMID: 31251452 DOI: 10.1002/jbio.201900056
19. Mayevsky A., Barbiro-Michaely E. Shedding light on mitochondrial function by real time monitoring of NADH fluorescence: I. Basic methodology and animal studies. *J. Clin. Monit. Comput.* 2013; 27 (1): 1–34. PMID: 23203204 DOI: 10.1007/s10877-012-9414-5
20. Mayevsky A., Rogatsky G.G. Mitochondrial function *in vivo* evaluated by NADH fluorescence: from animal models to human studies. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2007; 292 (2): 615–640. PMID: 16943239 DOI: 10.1152/ajpcell.00249.2006
21. Heikal A.A. Intracellular coenzymes as natural biomarkers for metabolic activities and mitochondrial anomalies. *Biomark. Med.* 2010; 4 (2): 241–263. DOI: 10.2217/bmm.10.1
22. Shehada R.E., Marmarelis V.Z., Mansour H.N., Grundfest W.S. Laser induced fluorescence attenuation spectroscopy: detection of hypoxia. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 2000; 47 (3): 301–312. PMID: 10743771 DOI: 10.1109/10.827290
23. Lu H.H., Wu Y.M., Chang W.T., Luo T., Yang Y.C., Cho H.D., Liao I. Molecular imaging of ischemia and reperfusion *in vivo* with mitochondrial autofluorescence. *Anal. Chem.* 2014; 86 (10): 5024–5031. PMID: 24720791 DOI: 10.1021/ac5006469
24. Hosseini L., Vafaei M.S., Mahmoudi J., Badalzadeh R. Nicotinamide adenine dinucleotide emerges as a therapeutic target in aging and ischemic conditions. *Biogerontology*. 2019; 20 (4): 381–395. PMID: 30838484 DOI: 10.1007/s10522-019-09805-6
25. Aboumarzouk O., Valentine R., Buist R., Ahmad S., Nabi G., Eljamel S., Moseley H., Kata S.G. Laser-induced autofluorescence spec-

References

1. Abramova E.A., Voennov O.V., Boyarinov G.A., Trofimov A.O. Cerebral Circulation and Metabolism of Patients with Cerebral Injury. *Obshchaya reanimatologiya=General Reanimatology*. 2018; 14 (1): 4–11. [In Russ.] DOI: 10.15360/1813-9779-2018-1-4-11
2. Ryzhkov I.A., Zarzhetsky Y.V., Novodержкина I.S. Comparative Aspects of the Regulation of Cutaneous and Cerebral Microcirculation During Acute Blood Loss. *Obshchaya reanimatologiya=General Reanimatology*. 2017; 13 (6): 18–27. [In Russ.] DOI: 10.15360/1813-9779-2017-6-18-27
3. Babkina A.S., Golubev A.M., Sundukov D.V., Bashirova A.R., Golubev M.A. Clozapine: Mechanisms of Toxicity and Side Effects. *Obshchaya reanimatologiya=General Reanimatology*. 2018; 14 (2): 35–45. [In Russ.] DOI: 10.15360/1813-9779-2018-2-35-45
4. Rogatkin D.A. Physical fundamentals of *in vivo* laser clinical fluorescence spectroscopy. *Meditinskaya fizika*. 2014; 4 (64): 78–96 [In Russ.]
5. Vekshin N. L. fluorescence spectroscopy of polymers. Pushchino: Photon-vek; 2008. [In Russ.] ISBN: 978-5-903789-07-8
6. Monici M. Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. *Biotechnol. Annu. Rev.* 2005; 11: 227–256. PMID: 16216779 DOI: 10.1016/S1387-2656 (05)11007-2
7. Lukina M.M., Shirmanova M.V., Sergeeva T.F., Zagajnova E.V. Metabolic imaging in the study of cancer processes (review). *Sovremennye tekhnologii v medicine* 2016; 8 (4): 113–128. [In Russ.] DOI: 10.17691/stm2016.8.4.16
8. Danylovych H.V. Evaluation of functioning of mitochondrial electron transport chain with NADH and FAD autofluorescence. *Ukr. Biochem. J.* 2016; 88 (1): 31–43. PMID: 29227076 DOI: 10.15407/ubj88.01.031
9. Syasin N.I., Borisova O.N. Autofluorescence, cellular respiration and the modern possibilities of its non-invasive research (literature review). *Vestnik novykh medicinskih tekhnologij. Elektronnyj zhurnal* 2014; 1. [In Russ.] DOI 10.12737/3438
10. Bartolomé F., Abramov A.Y. Measurement of mitochondrial NADH and FAD autofluorescence in live cells. *Methods. Mol. Biol.* 2015; 1264: 263–720. PMID: 25631020 DOI: 10.1007/978-1-4939-2257-4_23
11. Blacker T.S., Duchon M.R. Investigating mitochondrial redox state using NADH and NADPH autofluorescence. *Free Radic. Biol. Med.* 2016; 100: 53–65. PMID: 27519271 DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.08.010
12. Danylovych H.V. Evaluation of functioning of mitochondrial electron transport chain with NADH and FAD autofluorescence. *Ukr. Biochem. J.* 2016; 88 (1): 31–43. PMID: 29227076 DOI: 10.15407/ubj88.01.031
13. Croce A.C., Bottiroli G. Autofluorescence Spectroscopy for Monitoring Metabolism in Animal Cells and Tissues. *Methods Mol. Biol.* 2017; 1560: 15–43. PMID: 28155143 DOI: 10.1007/978-1-4939-6788-9_2
14. Kolenc O.I., Quinn K.P. Evaluating Cell Metabolism Through Autofluorescence Imaging of NAD (P)H and FAD. *Antioxid. Redox Signal.* 2019; 30 (6): 875–889. PMID: 29268621 DOI: 10.1089/ars.2017.7451
15. Plettenberg H.K., Hoffmann M. Applications of autofluorescence for characterisation of biological systems (biomonitoring). *Biomed. Tech. (Berl.)*. 2002; 47 (2): 596–597. PMID: 12465247 DOI: 10.1515/bmte.2002.47.s1b.596
16. Chacko J.V., Eliceiri K.W. Autofluorescence lifetime imaging of cellular metabolism: Sensitivity toward cell density, pH, intracellular, and intercellular heterogeneity. *Cytometry A*. 2019; 95 (1): 56–69. PMID: 30296355 DOI: 10.1002/cyto.a.23603
17. Schaefer P.M., Kalinina S., Rueck A., von Arnim C.A.F., von Einem B. NADH Autofluorescence-A Marker on its Way to Boost Bioenergetic Research. *Cytometry A*. 2019; 95 (1): 34–46. PMID: 30211978 DOI: 10.1002/cyto.a.23597
18. Raghushaker C.R., Chandra S., Chakrabarty S., Kabekkodu S.P., Satyamoorthy K., Mahato K.K. Detection of mitochondrial dysfunction *in vitro* by laser-induced autofluorescence. *J. Biophotonics*. 2019; 28: e201900056. PMID: 31251452 DOI: 10.1002/jbio.201900056
19. Mayevsky A., Barbiro-Michaely E. Shedding light on mitochondrial function by real time monitoring of NADH fluorescence: I. Basic methodology and animal studies. *J. Clin. Monit. Comput.* 2013; 27 (1): 1–34. PMID: 23203204 DOI: 10.1007/s10877-012-9414-5
20. Mayevsky A., Rogatsky G.G. Mitochondrial function *in vivo* evaluated by NADH fluorescence: from animal models to human studies. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2007; 292 (2): 615–640. PMID: 16943239 DOI: 10.1152/ajpcell.00249.2006
21. Heikal A.A. Intracellular coenzymes as natural biomarkers for metabolic activities and mitochondrial anomalies. *Biomark. Med.* 2010; 4 (2): 241–263. DOI: 10.2217/bmm.10.1
22. Shehada R.E., Marmarelis V.Z., Mansour H.N., Grundfest W.S. Laser induced fluorescence attenuation spectroscopy: detection of hypoxia. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 2000; 47 (3): 301–312. PMID: 10743771 DOI: 10.1109/10.827290
23. Lu H.H., Wu Y.M., Chang W.T., Luo T., Yang Y.C., Cho H.D., Liao I. Molecular imaging of ischemia and reperfusion *in vivo* with mitochondrial autofluorescence. *Anal. Chem.* 2014; 86 (10): 5024–5031. PMID: 24720791 DOI: 10.1021/ac5006469
24. Hosseini L., Vafaei M.S., Mahmoudi J., Badalzadeh R. Nicotinamide adenine dinucleotide emerges as a therapeutic target in aging and ischemic conditions. *Biogerontology*. 2019; 20 (4): 381–395. PMID: 30838484 DOI: 10.1007/s10522-019-09805-6
25. Aboumarzouk O., Valentine R., Buist R., Ahmad S., Nabi G., Eljamel S., Moseley H., Kata S.G. Laser-induced autofluorescence spectroscopy

- troscopy: can it be of importance in detection of bladder lesions? *Photodiagnosis. Photodyn. Ther.* 2015; 12 (1): 76–83. PMID: 25560417 DOI: 10.1016/j.pdpdt.2014.12.003
26. Iga N., Oto T., Okada M., Harada M., Nishikawa H., Miyoshi K., Otani S., Sugimoto S., Yamane M., Toyooka S., Miyoshi S. Detection of airway ischaemic damage after lung transplantation by using autofluorescence imaging bronchoscopy. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 2014; 45 (3): 509–513. PMID: 23999558 DOI: 10.1093/ejcts/ezt437
 27. Kretschmer S., Pieper M., Hüttmann G., Bölke T., Wollenberg B., Marsh L.M., Garn H., König P. Autofluorescence multiphoton microscopy for visualization of tissue morphology and cellular dynamics in murine and human airways. *Lab. Invest.* 2016; 96 (8): 918–931. PMID: 27400364 PMID: PMC4972900 DOI: 10.1038/labinvest.2016.69
 28. Chacko J.V., Eliceiri K.W. Autofluorescence lifetime imaging of cellular metabolism: Sensitivity toward cell density, pH, intracellular, and intercellular heterogeneity. *Cytometry A.* 2019; 95 (1): 56–69. PMID: 30296355 DOI: 10.1002/cyto.a.23603
 29. Alam S.R., Wallrabe H., Svindrych Z., Chaudhary A.K., Christopher K.G., Chandra D., Periasamy A. Investigation of Mitochondrial Metabolic Response to Doxorubicin in Prostate Cancer Cells: An NADH, FAD and Tryptophan FLIM Assay. *Sci. Rep.* 2017; 7 (1): 10451. PMID: 28874842 DOI: 10.1038/s41598-017-10856-3
 30. Li B.H., Xie S.S. Autofluorescence excitation-emission matrices for diagnosis of colonic cancer. *World J. Gastroenterol.* 2005; 11 (25): 3931–3934. PMID: 15991296 DOI: 10.3748/wjg.v11.i25.3931
 31. Салмин В.В., Салмина А.Б., Фурсов А.А., Фролова О.В., Лалетин Д.И., Фурсов М.А., Юдин Г.В., Малиновская Н.А., Зыкова Л.Д., Проворова А.С. Использование флуоресцентной спектроскопии для оценки ишемического повреждения миокарда. *Journal of Siberian Federal University* 2011; 2 (4): 142–157
 32. Fitzgerald J.T., Michalopoulos A., Pivetti C.D., Raman R.N., Troppmann C., Demos S.G. Real-time assessment of in vivo renal ischemia using laser autofluorescence imaging. *J. Biomed. Opt.* 2005; 10 (4): 44018. PMID: 16178651 DOI: 10.1117/1.1993327
 33. Tirapelli L.F., Bagnato V.S., Tirapelli D.P., Kurachi C., Barione D.F., Tucci S. Jr., Suaid H.J., Cologna A.J., Martins A.C. Renal ischemia in rats: mitochondria function and laser autofluorescence. *Transplant. Proc.* 2008; 40 (5): 1679–1684. PMID: 18589172 DOI: 10.1016/j.transproceed.2008.02.081
 34. Tirapelli L.F., Trazzi B.F., Bagnato V.S., Tirapelli D.P., Kurachi C., da Costa M.M., Tucci S. Jr., Cologna A.J., Martins A.C. Histopathology and laser autofluorescence of ischemic kidneys of rats. *Lasers Med. Sci.* 2009; 24 (3): 397–404. PMID: 18581159 DOI: 10.1007/s10103-008-0578-74
 35. Raman R.N., Pivetti C.D., Ramsamooj R., Troppmann C., Demos S.G. Predictive assessment of kidney functional recovery following ischemic injury using optical spectroscopy. *J. Biomed. Opt.* 2017; 22 (5): 56001. PMID: 28467536 DOI: 10.1117/1.JBO.22.5.056001
 36. Croce A.C., Ferrigno A., Bottirollo G., Vairetti M. Autofluorescence-based optical biopsy: An effective diagnostic tool in hepatology. *Liver Int.* 2018; 38 (7): 1160–1174. PMID: 29624848 DOI: 10.1111/liv.13753
 37. Nazeer S.S., Saraswathy A., Shenoy S.J., Jayasree R.S. Fluorescence spectroscopy as an efficient tool for staging the degree of liver fibrosis: an in vivo comparison with MRI. *Sci. Rep.* 2018; 8 (1): 10967. PMID: 30030510 DOI: 10.1038/s41598-018-29370-1
 38. La Cour M.F., Mehrvar S., Kim J., Martin A., Zimmerman M.A., Hong J.C., Ranji M. Optical imaging for the assessment of hepatocyte metabolic state in ischemia and reperfusion injuries. *Biomed. Opt. Express.* 2017; 8 (10): 4419–4426. PMID: 29082074 DOI: 10.1364/BOE.8.004419
 39. Croce A.C., Ferrigno A., Santin G., Piccolini V.M., Bottirollo G., Vairetti M. Autofluorescence of liver tissue and bile: organ functionality monitoring during ischemia and reoxygenation. *Lasers Surg. Med.* 2014; 46 (5): 412–421. PMID: 24619664 DOI: 10.1002/lsm.22241
 40. Арутюнян А.В., Черданцев Д.В., Салмин В.В., Скомороха Д.П., Салмина А.Б. Интраоперационная лазер-индуцированная флуоресцентная спектроскопия при экспериментальном панкреатите. *Сибирское медицинское обозрение* 2012; 77 (5): 20–24.
 41. Smelt M.J., Faas M.M., de Haan B.J., de Vos P. Pancreatic beta-cell purification by altering FAD and NAD (P)H metabolism. *Exp. Diabetes Res.* 2008; 2008: 165360. PMID: 18670618 DOI: 10.1155/2008/165360
 42. Шинкин М.В., Звенигородская Л.А., Мкртумян А.М. Лазерная доплеровская флоуметрия и флуоресцентная спектроскопия как методы оценки доклинических проявлений синдрома диабетической стопы. *Эффективная фармакотерапия* 2018; 18: 6–12.
 43. Staniszeuski K., Audi S.H., Sepehr R., Jacobs E.R., Ranji M. Surface fluorescence studies of tissue mitochondrial redox state in isolated perfused rat lungs. *Ann Biomed Eng.* 2013 Apr; 41 (4): 827–836. PMID: 23238793 PMID: PMC3606690 DOI: 10.1007/s10439-012-0716-z
 44. Kosterin P., Kim G.H., Muschol M., Obaid A.L., Salzberg B.M. Changes in FAD and NADH fluorescence in neurosecretory terminals are triggered by calcium entry and by ADP production. *J. Membr. Biol.* 2005; 208 (2): 113–124. PMID: 16645741 DOI: 10.1007/s00232-005-0824-x
 45. Reinert K.C., Dunbar R.L., Gao W., Chen G., Ebner T.J. Flavoprotein autofluorescence imaging of neuronal activation in the cerebellar cortex *in vivo*. *J. Neurophysiol.* 2004; 92 (1): 199–211. PMID: 14985415 DOI: 10.1152/jn.01275.2003
 46. Mayevsky A. Brain NADH redox state monitored *in vivo* by fiber optic surface fluorometry. *Brain Res.* 1984; 319 (1): 49–68. PMID: 6370376 DOI: 10.1016/0165-0173 (84)90029-8
 - copy: can it be of importance in detection of bladder lesions? *Photodiagnosis. Photodyn. Ther.* 2015; 12 (1): 76–83. PMID: 25560417 DOI: 10.1016/j.pdpdt.2014.12.003
 26. Iga N., Oto T., Okada M., Harada M., Nishikawa H., Miyoshi K., Otani S., Sugimoto S., Yamane M., Toyooka S., Miyoshi S. Detection of airway ischaemic damage after lung transplantation by using autofluorescence imaging bronchoscopy. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 2014; 45 (3): 509–513. PMID: 23999558 DOI: 10.1093/ejcts/ezt437
 27. Kretschmer S., Pieper M., Hüttmann G., Bölke T., Wollenberg B., Marsh L.M., Garn H., König P. Autofluorescence multiphoton microscopy for visualization of tissue morphology and cellular dynamics in murine and human airways. *Lab. Invest.* 2016; 96 (8): 918–931. PMID: 27400364 PMID: PMC4972900 DOI: 10.1038/labinvest.2016.69
 28. Chacko J.V., Eliceiri K.W. Autofluorescence lifetime imaging of cellular metabolism: Sensitivity toward cell density, pH, intracellular, and intercellular heterogeneity. *Cytometry A.* 2019; 95 (1): 56–69. PMID: 30296355 DOI: 10.1002/cyto.a.23603
 29. Alam S.R., Wallrabe H., Svindrych Z., Chaudhary A.K., Christopher K.G., Chandra D., Periasamy A. Investigation of Mitochondrial Metabolic Response to Doxorubicin in Prostate Cancer Cells: An NADH, FAD and Tryptophan FLIM Assay. *Sci. Rep.* 2017; 7 (1): 10451. PMID: 28874842 DOI: 10.1038/s41598-017-10856-3
 30. Li B.H., Xie S.S. Autofluorescence excitation-emission matrices for diagnosis of colonic cancer. *World J. Gastroenterol.* 2005; 11 (25): 3931–3934. PMID: 15991296 DOI: 10.3748/wjg.v11.i25.3931
 31. Salmin V.V., Salmina A.B., Fursov A.A., Frolova O.V., Laletin D.I., Fursov M.A., Yudin G.V., Malinovskaya N.A., Zykova L.D., Provorova A.S. The use of fluorescence spectroscopy to assess ischemic myocardial damage. *Journal of Siberian Federal University* 2011; 2 (4): 142–157 [In Russ.]
 32. Fitzgerald J.T., Michalopoulos A., Pivetti C.D., Raman R.N., Troppmann C., Demos S.G. Real-time assessment of in vivo renal ischemia using laser autofluorescence imaging. *J. Biomed. Opt.* 2005; 10 (4): 44018. PMID: 16178651 DOI: 10.1117/1.1993327
 33. Tirapelli L.F., Bagnato V.S., Tirapelli D.P., Kurachi C., Barione D.F., Tucci S. Jr., Suaid H.J., Cologna A.J., Martins A.C. Renal ischemia in rats: mitochondria function and laser autofluorescence. *Transplant. Proc.* 2008; 40 (5): 1679–1684. PMID: 18589172 DOI: 10.1016/j.transproceed.2008.02.081
 34. Tirapelli L.F., Trazzi B.F., Bagnato V.S., Tirapelli D.P., Kurachi C., da Costa M.M., Tucci S. Jr., Cologna A.J., Martins A.C. Histopathology and laser autofluorescence of ischemic kidneys of rats. *Lasers Med. Sci.* 2009; 24 (3): 397–404. PMID: 18581159 DOI: 10.1007/s10103-008-0578-74
 35. Raman R.N., Pivetti C.D., Ramsamooj R., Troppmann C., Demos S.G. Predictive assessment of kidney functional recovery following ischemic injury using optical spectroscopy. *J. Biomed. Opt.* 2017; 22 (5): 56001. PMID: 28467536 DOI: 10.1117/1.JBO.22.5.056001
 36. Croce A.C., Ferrigno A., Bottirollo G., Vairetti M. Autofluorescence-based optical biopsy: An effective diagnostic tool in hepatology. *Liver Int.* 2018; 38 (7): 1160–1174. PMID: 29624848 DOI: 10.1111/liv.13753
 37. Nazeer S.S., Saraswathy A., Shenoy S.J., Jayasree R.S. Fluorescence spectroscopy as an efficient tool for staging the degree of liver fibrosis: an in vivo comparison with MRI. *Sci. Rep.* 2018; 8 (1): 10967. PMID: 30030510 DOI: 10.1038/s41598-018-29370-1
 38. La Cour M.F., Mehrvar S., Kim J., Martin A., Zimmerman M.A., Hong J.C., Ranji M. Optical imaging for the assessment of hepatocyte metabolic state in ischemia and reperfusion injuries. *Biomed. Opt. Express.* 2017; 8 (10): 4419–4426. PMID: 29082074 DOI: 10.1364/BOE.8.004419
 39. Croce A.C., Ferrigno A., Santin G., Piccolini V.M., Bottirollo G., Vairetti M. Autofluorescence of liver tissue and bile: organ functionality monitoring during ischemia and reoxygenation. *Lasers Surg. Med.* 2014; 46 (5): 412–421. PMID: 24619664 DOI: 10.1002/lsm.22241
 40. Arutyunyan A.V., Cherdancev D.V., Salmin V.V., Skomorokha D.P., Salmina A.B. Intraoperative laser-induced fluorescence spectroscopy in experimental pancreatitis. *Sibirskoe medicinskoe obozrenie* 2012; 77 (5): 20–24 [In Russ.]
 41. Smelt M.J., Faas M.M., de Haan B.J., de Vos P. Pancreatic beta-cell purification by altering FAD and NAD (P)H metabolism. *Exp. Diabetes Res.* 2008; 2008: 165360. PMID: 18670618 DOI: 10.1155/2008/165360
 42. Shinkin M.V., Zvenigorodskaya L.A., Mkrtyunyan A.M. Laser Doppler flowmetry and fluorescence spectroscopy as methods for assessing the preclinical manifestations of diabetic foot syndrome. *Effektivnaya farmakoterapiya* 2018; 18: 6–12 [In Russ.]
 43. Staniszeuski K., Audi S.H., Sepehr R., Jacobs E.R., Ranji M. Surface fluorescence studies of tissue mitochondrial redox state in isolated perfused rat lungs. *Ann Biomed Eng.* 2013 Apr; 41 (4): 827–836. PMID: 23238793 PMID: PMC3606690 DOI: 10.1007/s10439-012-0716-z
 44. Kosterin P., Kim G.H., Muschol M., Obaid A.L., Salzberg B.M. Changes in FAD and NADH fluorescence in neurosecretory terminals are triggered by calcium entry and by ADP production. *J. Membr. Biol.* 2005; 208 (2): 113–124. PMID: 16645741 DOI: 10.1007/s00232-005-0824-x
 45. Reinert K.C., Dunbar R.L., Gao W., Chen G., Ebner T.J. Flavoprotein autofluorescence imaging of neuronal activation in the cerebellar cortex *in vivo*. *J. Neurophysiol.* 2004; 92 (1): 199–211. PMID: 14985415 DOI: 10.1152/jn.01275.2003
 46. Mayevsky A. Brain NADH redox state monitored *in vivo* by fiber optic surface fluorometry. *Brain Res.* 1984; 319 (1): 49–68. PMID: 6370376 DOI: 10.1016/0165-0173 (84)90029-8

47. Салмина А.Б., Салмин В.В., Фролова О.В., Лалетин Д.И., Фурсов М.А., Скомориха Д.П., Фурсов А.А., Кондрашов М.А., Медведева Н.Н., Малиновская Н.А., Маторова Н.С. Лазер-индуцированная аутофлуоресценция для оценки метаболизма и гемодинамики головного мозга. *Клиническая неврология* 2011; 5 (3): 32–38.
48. Yaseen M.A., Srinivasan V.J., Gorczynska I., Fujimoto J.G., Boas D.A., Sakadžić S. Multimodal optical imaging system for in vivo investigation of cerebral oxygen delivery and energy metabolism. *Biomed Opt. Express*. 2015; 6 (12): 4994–5007. PMID: 26713212 DOI: 10.1364/BOE.6.004994
49. Ivanov A., Zilberter Y. Critical state of energy metabolism in brain slices: the principal role of oxygen delivery and energy substrates in shaping neuronal activity. *Front Neuroenergetics*. 2011; 3: 9. PMID: 22232599 DOI: 10.3389/fnene.2011.00009
50. Yaseen M.A., Sakadžić S., Wu W., Becker W., Kasischke K.A., Boas D.A. In vivo imaging of cerebral energy metabolism with two-photon fluorescence lifetime microscopy of NADH. *Biomed Opt. Express*. 2013; 4 (2): 307–321. PMID: 23412419 DOI: 10.1364/BOE.4.000307
51. Ten V., Galkin A. Mechanism of mitochondrial complex I damage in brain ischemia/reperfusion injury. A hypothesis. *Mol. Cell Neurosci*. 2019; 100: 103408. PMID: 31494262 DOI: 10.1016/j.mcn.2019.103408
52. Sahni P.V., Zhang J., Sosunov S., Galkin A., Niatetskaya Z., Starkov A., Brookes P.S., Ten V.S. Krebs cycle metabolites and preferential succinate oxidation following neonatal hypoxic-ischemic brain injury in mice. *Pediatr. Res*. 2018; 83 (2): 491–497. PMID: 29211056 DOI: 10.1038/pr.2017.277
53. Stuntz E., Gong Y., Sood D., Liaudanskaya V., Pouli D., Quinn K.P., Alonzo C., Liu Z., Kaplan D.L., Georgakoudi I. Endogenous Two-Photon Excited Fluorescence Imaging Characterizes Neuron and Astrocyte Metabolic Responses to Manganese. *Toxicity. Sci. Rep*. 2017; 7 (1): 1041. PMID: 28432298 DOI: 10.1038/s41598-017-01015-9
54. Yanagawa Y., Osanai H., Tateno T. Transcranial flavoprotein-autofluorescence imaging of sound-evoked responses in the mouse auditory cortex under three types of anesthesia. *Neurosci. Lett*. 2016; 633: 189–195. PMID: 27641319 DOI: 10.1016/j.neulet.2016.09.021
55. Yaseen M.A., Sutin J., Wu W., Fu B., Uhlirova H., Devor A., Boas D.A., Sakadžić S. Fluorescence lifetime microscopy of NADH distinguishes alterations in cerebral metabolism in vivo. *Biomed. Opt. Express*. 2017; 8 (5): 2368–2385. PMID: 28663879 DOI: 10.1364/BOE.8.002368
56. Kahraman S., Fiskum G. Anoxia-induced changes in pyridine nucleotide redox state in cortical neurons and astrocytes. *Neurochem. Res*. 2007; 32 (4–5): 799–806. PMID: 17191134 DOI: 10.1007/s11064-006-9206-8
57. Polesskaya O., Sun A., Salahura G., Silva J.N., Dewhurst S., Kasischke K. Detection of microregional hypoxia in mouse cerebral cortex by two-photon imaging of endogenous NADH fluorescence. *J. Vis. Exp*. 2012; (60). pii: 3466. DOI: 10.3791/3466
58. Shi L., Lu L., Harvey G., Harvey T., Rodríguez-Contreras A., Alfano R.R. Label-free fluorescence spectroscopy for detecting key biomolecules in brain tissue from a mouse model of Alzheimer's disease. *Sci. Rep*. 2017; 7 (1): 2599. DOI: 10.1038/s41598-017-02673-5
59. Pascu A., Romanitan M.O., Delgado J.M., Danaila L., Pascu M.L. Laser-induced autofluorescence measurements on brain tissues. *Anat. Rec. (Hoboken)*. 2009; 292 (12): 2013–2022. PMID: 19943354 DOI: 10.1002/ar.21034
60. Zhu M., Chang W., Jing L., Fan Y., Liang P., Zhang X., Wang G., Liao H. Dual-modality optical diagnosis for precise in vivo identification of tumors in neurosurgery. *Theranostics*. 2019; 9 (10): 2827–2842. PMID: 31244926 DOI: 10.7150/thno.33823
61. Ibrahim B.A., Wang H., Lesicko A.M.H., Buccì B., Paul K., Llano D.A. Effect of temperature on FAD and NADH-derived signals and neurometabolic coupling in the mouse auditory and motor cortex. *Pflugers. Arch*. 2017 Dec.; 469 (12): 1631–1649. PMID: 28785802 DOI: 10.1007/s00424-017-2037-4
62. Reinert K.C., Gao W., Chen G., Ebner T.J. Flavoprotein autofluorescence imaging in the cerebellar cortex in vivo. *J. Neurosci Res*. 2007; 85 (15): 3221–3232. PMID: 17520745 DOI: 10.1002/jnr.21348
63. Huang Q., Sun M., Li M., Zhang D., Han F., Wu J.C., Fukunaga K., Chen Z., Qin Z.H. Combination of NAD⁺ and NADPH Offers Greater Neuroprotection in Ischemic Stroke Models by Relieving Metabolic Stress. *Mol. Neurobiol*. 2018; 55 (7): 6063–6075. PMID: 29164394 DOI: 10.1007/s12035-017-0809-7
64. Papayan G., Petrishchev N., Galagudza M. Autofluorescence spectroscopy for NADH and flavoproteins redox state monitoring in the isolated rat heart subjected to ischemia-reperfusion. *Photodiagnosis Photodyn. Ther*. 2014; 11 (3): 400–408. PMID: 24854770 DOI: 10.1016/j.pdpdt.2014.05.003
65. Lagarto J.L., Dyer B.T., Peters N.S., French P.M.W., Dunsby C., Lyon A.R. In vivo label-free optical monitoring of structural and metabolic remodeling of myocardium following infarction. *Biomed. Opt. Express*. 2019; 10 (7): 3506–3521. DOI: 10.1364/BOE.10.003506
66. Lagarto J.L., Dyer B.T., Talbot C.B., Peters N.S., French P.M.W., Lyon A.R., Dunsby C. Characterization of NAD (P)H and FAD autofluorescence signatures in a Langendorff isolated-perfused rat heart model. *Biomed Opt. Express*. 2018; 9 (10): 4961–4978. DOI: 10.1364/BOE.9.004961
67. Lagarto J., Dyer B.T., Talbot C., Sikkil M.B., Peters N.S., French P.M., Lyon A.R., Dunsby C. Application of time-resolved autofluorescence to label-free in vivo optical mapping of changes in tissue matrix and
47. Salmina A.B., Salmin V.V., Frolova O.V., Laletin D.I., Fursov M.A., Skomoroха D.P., Fursov A.A., Kondrashov M.A., Medvedeva N.N., Malinovskaya N.A., Mantorova N.S. Laser-induced autofluorescence to evaluate brain metabolism and hemodynamics. *Klinicheskaya neurologiya* 2011; 5 (3): 32–38 [In Russ.]
48. Yaseen M.A., Srinivasan V.J., Gorczynska I., Fujimoto J.G., Boas D.A., Sakadžić S. Multimodal optical imaging system for in vivo investigation of cerebral oxygen delivery and energy metabolism. *Biomed Opt. Express*. 2015; 6 (12): 4994–5007. PMID: 26713212 DOI: 10.1364/BOE.6.004994
49. Ivanov A., Zilberter Y. Critical state of energy metabolism in brain slices: the principal role of oxygen delivery and energy substrates in shaping neuronal activity. *Front Neuroenergetics*. 2011; 3: 9. PMID: 22232599 DOI: 10.3389/fnene.2011.00009
50. Yaseen M.A., Sakadžić S., Wu W., Becker W., Kasischke K.A., Boas D.A. In vivo imaging of cerebral energy metabolism with two-photon fluorescence lifetime microscopy of NADH. *Biomed Opt. Express*. 2013; 4 (2): 307–321. PMID: 23412419 DOI: 10.1364/BOE.4.000307
51. Ten V., Galkin A. Mechanism of mitochondrial complex I damage in brain ischemia/reperfusion injury. A hypothesis. *Mol. Cell Neurosci*. 2019; 100: 103408. PMID: 31494262 DOI: 10.1016/j.mcn.2019.103408
52. Sahni P.V., Zhang J., Sosunov S., Galkin A., Niatetskaya Z., Starkov A., Brookes P.S., Ten V.S. Krebs cycle metabolites and preferential succinate oxidation following neonatal hypoxic-ischemic brain injury in mice. *Pediatr. Res*. 2018; 83 (2): 491–497. PMID: 29211056 DOI: 10.1038/pr.2017.277
53. Stuntz E., Gong Y., Sood D., Liaudanskaya V., Pouli D., Quinn K.P., Alonzo C., Liu Z., Kaplan D.L., Georgakoudi I. Endogenous Two-Photon Excited Fluorescence Imaging Characterizes Neuron and Astrocyte Metabolic Responses to Manganese. *Toxicity. Sci. Rep*. 2017; 7 (1): 1041. PMID: 28432298 DOI: 10.1038/s41598-017-01015-9
54. Yanagawa Y., Osanai H., Tateno T. Transcranial flavoprotein-autofluorescence imaging of sound-evoked responses in the mouse auditory cortex under three types of anesthesia. *Neurosci. Lett*. 2016; 633: 189–195. PMID: 27641319 DOI: 10.1016/j.neulet.2016.09.021
55. Yaseen M.A., Sutin J., Wu W., Fu B., Uhlirova H., Devor A., Boas D.A., Sakadžić S. Fluorescence lifetime microscopy of NADH distinguishes alterations in cerebral metabolism in vivo. *Biomed. Opt. Express*. 2017; 8 (5): 2368–2385. PMID: 28663879 DOI: 10.1364/BOE.8.002368
56. Kahraman S., Fiskum G. Anoxia-induced changes in pyridine nucleotide redox state in cortical neurons and astrocytes. *Neurochem. Res*. 2007; 32 (4–5): 799–806. PMID: 17191134 DOI: 10.1007/s11064-006-9206-8
57. Polesskaya O., Sun A., Salahura G., Silva J.N., Dewhurst S., Kasischke K. Detection of microregional hypoxia in mouse cerebral cortex by two-photon imaging of endogenous NADH fluorescence. *J. Vis. Exp*. 2012; (60). pii: 3466. DOI: 10.3791/3466
58. Shi L., Lu L., Harvey G., Harvey T., Rodríguez-Contreras A., Alfano R.R. Label-free fluorescence spectroscopy for detecting key biomolecules in brain tissue from a mouse model of Alzheimer's disease. *Sci. Rep*. 2017; 7 (1): 2599. DOI: 10.1038/s41598-017-02673-5
59. Pascu A., Romanitan M.O., Delgado J.M., Danaila L., Pascu M.L. Laser-induced autofluorescence measurements on brain tissues. *Anat. Rec. (Hoboken)*. 2009; 292 (12): 2013–2022. PMID: 19943354 DOI: 10.1002/ar.21034
60. Zhu M., Chang W., Jing L., Fan Y., Liang P., Zhang X., Wang G., Liao H. Dual-modality optical diagnosis for precise in vivo identification of tumors in neurosurgery. *Theranostics*. 2019; 9 (10): 2827–2842. PMID: 31244926 DOI: 10.7150/thno.33823
61. Ibrahim B.A., Wang H., Lesicko A.M.H., Buccì B., Paul K., Llano D.A. Effect of temperature on FAD and NADH-derived signals and neurometabolic coupling in the mouse auditory and motor cortex. *Pflugers. Arch*. 2017 Dec.; 469 (12): 1631–1649. PMID: 28785802 DOI: 10.1007/s00424-017-2037-4
62. Reinert K.C., Gao W., Chen G., Ebner T.J. Flavoprotein autofluorescence imaging in the cerebellar cortex in vivo. *J. Neurosci Res*. 2007; 85 (15): 3221–3232. PMID: 17520745 DOI: 10.1002/jnr.21348
63. Huang Q., Sun M., Li M., Zhang D., Han F., Wu J.C., Fukunaga K., Chen Z., Qin Z.H. Combination of NAD⁺ and NADPH Offers Greater Neuroprotection in Ischemic Stroke Models by Relieving Metabolic Stress. *Mol. Neurobiol*. 2018; 55 (7): 6063–6075. PMID: 29164394 DOI: 10.1007/s12035-017-0809-7
64. Papayan G., Petrishchev N., Galagudza M. Autofluorescence spectroscopy for NADH and flavoproteins redox state monitoring in the isolated rat heart subjected to ischemia-reperfusion. *Photodiagnosis Photodyn. Ther*. 2014; 11 (3): 400–408. PMID: 24854770 DOI: 10.1016/j.pdpdt.2014.05.003
65. Lagarto J.L., Dyer B.T., Peters N.S., French P.M.W., Dunsby C., Lyon A.R. In vivo label-free optical monitoring of structural and metabolic remodeling of myocardium following infarction. *Biomed. Opt. Express*. 2019; 10 (7): 3506–3521. DOI: 10.1364/BOE.10.003506
66. Lagarto J.L., Dyer B.T., Talbot C.B., Peters N.S., French P.M.W., Lyon A.R., Dunsby C. Characterization of NAD (P)H and FAD autofluorescence signatures in a Langendorff isolated-perfused rat heart model. *Biomed Opt. Express*. 2018; 9 (10): 4961–4978. DOI: 10.1364/BOE.9.004961
67. Lagarto J., Dyer B.T., Talbot C., Sikkil M.B., Peters N.S., French P.M., Lyon A.R., Dunsby C. Application of time-resolved autofluorescence to label-free in vivo optical mapping of changes in tissue matrix and

- metabolism associated with myocardial infarction and heart failure. *Biomed. Opt. Express*. 2015; 6 (2): 324–346. PMID: 25780727 DOI: 10.1364/BOE.6.000324
68. Yamani M.H., van de Poll S.W., Ratliff N.B., Kuban B.E., Starling R.C., McCarthy P.M., Young J.B. Fluorescence spectroscopy of endomyocardial tissue post-human heart transplantation: does it correlate with histopathology? *J. Heart Lung Transplant*. 2000; 19 (11): 1077–1080. DOI: 10.1016/s1053-2498(00)00161-3
 69. Horvath K.A., Schomacker K.T., Lee C.C., Cohn L.H. Intraoperative myocardial ischemia detection with laser-induced fluorescence. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg*. 1994; 107 (1): 220–225. PMID: 8283889
 70. Aldakkak M., Stowe D.F., Lesnfsky E.J., Heisner J.S., Chen Q., Camara A.K. Modulation of mitochondrial bioenergetics in the isolated Guinea pig beating heart by potassium and lidocaine cardioplegia: implications for cardioprotection. *J. Cardiovasc. Pharmacol*. 2009; 54 (4): 298–309. DOI: 10.1097/FJC.0b013e3181b2b842
 71. Ranji M., Motlagh M.M., Salehpour F., Sepehr R., Heisner J.S., Dash R.K., Camara A.K. Optical Cryoimaging Reveals a Heterogeneous Distribution of Mitochondrial Redox State in *ex vivo* Guinea Pig Hearts and Its Alteration During Ischemia and Reperfusion. *IEEE J. Transl. Eng. Health Med*. 2016; 4: 1800210. PMID: 27574574 DOI: 10.1109/JTEHM.2016.2570219
 72. Wengrowski A.M., Kuzmiak-Glancy S., Jaimes R., Kay M.W. NADH changes during hypoxia, ischemia, and increased work differ between isolated heart preparations. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. 2014; 306 (4): H529–537. PMID: 24337462 DOI: 10.1152/ajpheart.00696.2013
 73. Taylor D., Bhandari S., Seymour A.M. Mitochondrial dysfunction in uremic cardiomyopathy. *Am. J. Physiol. Renal Physiol*. 2015; 308 (6): F579–587. DOI: 10.1152/ajprenal.00442.2014
 74. La Cour M.F., Mehrvar S., Heisner J.S., Motlagh M.M., Medhora M., Ranji M., Camara A.K. Optical metabolic imaging of irradiated rat heart exposed to ischemia-reperfusion injury. *J. Biomed. Opt*. 2018; 23 (1): 1–9. DOI: 10.1117/1.JBO.23.1.016011
 75. Stowe D.F., Gadicherla A.K., Zhou Y., Aldakkak M., Cheng Q., Kwok W.M., Jiang M.T., Heisner J.S., Yang M., Camara A.K. Protection against cardiac injury by small Ca (2+)-sensitive K (+) channels identified in guinea pig cardiac inner mitochondrial membrane. *Biochim. Biophys. Acta*. 2013; 1828 (2): 427–442. DOI: 10.1016/j.bbamem.2012.08.031
 76. Wüst R.C., Helmes M., Stienen G.J. Rapid changes in NADH and flavin autofluorescence in rat cardiac trabeculae reveal large mitochondrial complex II reserve capacity. *J. Physiol*. 2015; 593 (8): 1829–1840. PMID: 25640645 DOI: 10.1113/jphysiol.2014.286153
 77. Xu Z.H., Zhang Z.X., Wang J., Li Z., Liu X.L. Research on the autofluorescence spectroscopy of heart tissues. *Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi*. 2009; 29 (6): 1651–1655. PMID: 19810552
 78. Murphy T.H. Two-Photon Imaging of Neuronal Structural Plasticity in Mice during and after Ischemia. *Cold Spring Harb. Protoc*. 2015; 2015 (6): 548–557. PMID: 26034310 DOI: 10.1101/pdb.prot087486
 79. Hershberger K.A., Martin A.S., Hirschey M.D. Role of NAD+ and mitochondrial sirtuins in cardiac and renal diseases. *Nat. Rev. Nephrol*. 2017; 13 (4): 213–225. PMID: 28163307 DOI: 10.1038/nrneph.2017.5
 80. Akbar N., Sokolovski S., Dunaev A., Belch J.J., Rafailov E., Khan F. In vivo noninvasive measurement of skin autofluorescence biomarkers relate to cardiovascular disease in mice. *J. Microsc*. 2014; 255 (1): 42–48. PMID: 24811729 DOI: 10.1111/jmi.12135
 - metabolism associated with myocardial infarction and heart failure. *Biomed. Opt. Express*. 2015; 6 (2): 324–346. PMID: 25780727 DOI: 10.1364/BOE.6.000324
 68. Yamani M.H., van de Poll S.W., Ratliff N.B., Kuban B.E., Starling R.C., McCarthy P.M., Young J.B. Fluorescence spectroscopy of endomyocardial tissue post-human heart transplantation: does it correlate with histopathology? *J. Heart Lung Transplant*. 2000; 19 (11): 1077–1080. DOI: 10.1016/s1053-2498(00)00161-3
 69. Horvath K.A., Schomacker K.T., Lee C.C., Cohn L.H. Intraoperative myocardial ischemia detection with laser-induced fluorescence. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg*. 1994; 107 (1): 220–225. PMID: 8283889
 70. Aldakkak M., Stowe D.F., Lesnfsky E.J., Heisner J.S., Chen Q., Camara A.K. Modulation of mitochondrial bioenergetics in the isolated Guinea pig beating heart by potassium and lidocaine cardioplegia: implications for cardioprotection. *J. Cardiovasc. Pharmacol*. 2009; 54 (4): 298–309. DOI: 10.1097/FJC.0b013e3181b2b842
 71. Ranji M., Motlagh M.M., Salehpour F., Sepehr R., Heisner J.S., Dash R.K., Camara A.K. Optical Cryoimaging Reveals a Heterogeneous Distribution of Mitochondrial Redox State in *ex vivo* Guinea Pig Hearts and Its Alteration During Ischemia and Reperfusion. *IEEE J. Transl. Eng. Health Med*. 2016; 4: 1800210. PMID: 27574574 DOI: 10.1109/JTEHM.2016.2570219
 72. Wengrowski A.M., Kuzmiak-Glancy S., Jaimes R., Kay M.W. NADH changes during hypoxia, ischemia, and increased work differ between isolated heart preparations. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. 2014; 306 (4): H529–537. PMID: 24337462 DOI: 10.1152/ajpheart.00696.2013
 73. Taylor D., Bhandari S., Seymour A.M. Mitochondrial dysfunction in uremic cardiomyopathy. *Am. J. Physiol. Renal Physiol*. 2015; 308 (6): F579–587. DOI: 10.1152/ajprenal.00442.2014
 74. La Cour M.F., Mehrvar S., Heisner J.S., Motlagh M.M., Medhora M., Ranji M., Camara A.K. Optical metabolic imaging of irradiated rat heart exposed to ischemia-reperfusion injury. *J. Biomed. Opt*. 2018; 23 (1): 1–9. DOI: 10.1117/1.JBO.23.1.016011
 75. Stowe D.F., Gadicherla A.K., Zhou Y., Aldakkak M., Cheng Q., Kwok W.M., Jiang M.T., Heisner J.S., Yang M., Camara A.K. Protection against cardiac injury by small Ca (2+)-sensitive K (+) channels identified in guinea pig cardiac inner mitochondrial membrane. *Biochim. Biophys. Acta*. 2013; 1828 (2): 427–442. DOI: 10.1016/j.bbamem.2012.08.031
 76. Wüst R.C., Helmes M., Stienen G.J. Rapid changes in NADH and flavin autofluorescence in rat cardiac trabeculae reveal large mitochondrial complex II reserve capacity. *J. Physiol*. 2015; 593 (8): 1829–1840. PMID: 25640645 DOI: 10.1113/jphysiol.2014.286153
 77. Xu Z.H., Zhang Z.X., Wang J., Li Z., Liu X.L. Research on the autofluorescence spectroscopy of heart tissues. *Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi*. 2009; 29 (6): 1651–1655. PMID: 19810552
 78. Murphy T.H. Two-Photon Imaging of Neuronal Structural Plasticity in Mice during and after Ischemia. *Cold Spring Harb. Protoc*. 2015; 2015 (6): 548–557. PMID: 26034310 DOI: 10.1101/pdb.prot087486
 79. Hershberger K.A., Martin A.S., Hirschey M.D. Role of NAD+ and mitochondrial sirtuins in cardiac and renal diseases. *Nat. Rev. Nephrol*. 2017; 13 (4): 213–225. PMID: 28163307 DOI: 10.1038/nrneph.2017.5
 80. Akbar N., Sokolovski S., Dunaev A., Belch J.J., Rafailov E., Khan F. In vivo noninvasive measurement of skin autofluorescence biomarkers relate to cardiovascular disease in mice. *J. Microsc*. 2014; 255 (1): 42–48. PMID: 24811729 DOI: 10.1111/jmi.12135

Поступила 10.09.19

Received 10.09.19

Метаболизм микробиоты при критических состояниях (обзор и постулаты)

Н. В. Белобородова

НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского ФНКИЦ РР,
Россия, 107031, г. Москва, ул. Петровка, д. 25, стр. 2

Metabolism of Microbiota in Critical Illness (Review and Postulates)

Natalia V. Beloborodova

V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology,
Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitology,
25 Petrovka Str., Build. 2, 107031 Moscow, Russia

В данном обзоре обсуждается вопрос, почему нужно изучать механизмы действия и учитывать метаболизм микробиоты в организме тяжелообольного пациента, и каким образом специалисты в области клинического питания могут принять в этом самое активное участие

При критических состояниях дисрегуляция эндогенных обменных процессов и белково-энергетический дефицит усугубляются изменением направленности метаболических процессов микробиоты. Растет понимание важности изучения микробного метаболизма в общем метаболическом процессе. Перспективность развития этого направления для повышения эффективности лечения в реаниматологии и успешной реабилитации пациентов очевидна.

Существующие международные рекомендации по интенсивной терапии со временем могут быть пересмотрены в связи с появлением новых научных данных о механизмах критических состояний, связанных с метаболической активностью микробиоты человека. Идет поиск способов активного управления метаболическими процессами через подчинение метаболизма бактерий интересам хозяина. И антимикробные, и биопрепараты (пребиотики, метабитики) в перспективе будут применяться целенаправленно, под контролем ключевых микробных метаболитов, с использованием доступных методов лабораторного мониторинга.

На основе данных литературы и результатов собственных исследований автор формулирует постулаты о метаболизме микробиоты при критических состояниях, вводит понятия «дисфункции невидимого органа» и «сигнальных молекул бактерий», отвечает на вопрос «что делать?» и в качестве интегрального показателя предлагает использовать ряд микробных метаболитов ароматических аминокислот.

Ключевые слова: критическое состояние; метаболизм бактерий; микробиота; митохондриальная дисфункция; антимикробная терапия; биопрепараты

This article discusses the importance of eliciting the mechanisms of action and the metabolism of microbiota in the critically ill patients, as well as the role of nutrition specialist in the management of these patients.

In critically ill patients the impaired regulation of endogenous metabolic processes and protein-energy deficiency are aggravated by abnormal microbiota metabolic processes. There is growing awareness of the importance of studying microbial metabolism in the general metabolic process. Its implications for the improved efficacy of treatment in critical care and rehabilitation are obvious.

Current international intensive care guidelines are being constantly revised in response to the new research data available on the mechanisms of critical illness. The course of the latter may significantly associate with the metabolic activity of human microbiota. Active management of metabolic processes is being sought through the subordination of bacterial metabolism to the interests of the host. Both antimicrobial and bioformulations (prebiotics, metabiotics) will be used in the long term in a targeted manner with the control of key microbial metabolites through available laboratory monitoring tools.

Based on the literature data and the original research, the author formulates postulates of the microbiota metabolism in critical illness, introduces the concepts of «invisible organ dysfunction» and «signaling bacterial molecules», offers answers to the eternal «what is to be done?» question and suggests using a number of microbial aromatic amino acids metabolites as an integral indicator of a course of critical illness.

Keywords: critical states; metabolism of bacteria; microbiota; mitochondrial dysfunction; antimicrobial therapy; bio-drugs

DOI:10.15360/1813-9779-2019-6-62-79

Адресс для корреспонденции:

Наталья Владимировна Белобородова
E-mail: nvbeloborodova@yandex.ru

Correspondence to:

Natalia V. Beloborodova
E-mail: nvbeloborodova@yandex.ru

Микробный метаболизм и гомеостаз.

Постоянное присутствие в организме человека огромного числа сапрофитных и условно-патогенных микроорганизмов сопряжено с их метаболической активностью, что вызывает естественный интерес в связи с возможным вмешательством продуктов жизнедеятельности бактерий в метаболические процессы хозяина [1–5]. Особую важность этот вопрос приобретает, когда речь идет о реанимационных пациентах, выживаемость которых напрямую зависит от адекватной коррекции метаболических нарушений. Сложившиеся в онтогенезе механизмы участия микробиоты в регуляции и поддержании постоянства внутренней среды человека изучаются с растущим интересом, но на сегодняшний день все еще остаются без должного внимания и не учитываются в протоколах интенсивной терапии при критических состояниях [5]. Международные проекты по изучению микробиома человека подтвердили, что бактерии населяют все открытые эпителиальные поверхности, но основное их сообщество локализуется в кишечнике. Общее число бактерий в микробиоме в 10–100 раз превышает число клеток самого человека, а количество генов микробиоты кишечника в 150 раз превосходит число генов человека [2, 3]. В организме здорового человека представлены около 1000 видов микробов, 70% из которых не поддается микробиологическому культивированию, то есть не могут быть выделены в чистой культуре на питательных средах. Сегодня Состав микробиоты кишечника доступен детальному изучению путем метагеномного секвенирования с использованием 16S рибосомальных РНК (pPHK) по 16S pPHK [6]. Парадокс состоит в том, что с углублением наших знаний о микробиоме усугубляется впечатление необъятности и непознаваемости «микро-вселенной», живущей внутри человека. Иногда клиницистов отпугивает сложность и громоздкость исследований микробиома, что на практике не способствует новым решениям. В качестве одной из задач наших исследований является достижение простоты в понимании процессов интеграции метаболизма и максимальное приближение методов исследования ключевых микробных метаболитов к решению практических вопросов, в том числе — в области оптимизации клинического питания.

Метаболизм нутриентов в желудочно-кишечном тракте — многостадийный процесс, зависящий от многих факторов, которые в свою очередь в значительной степени изменены и принципиально отличаются у реанимационных пациентов по сравнению со здоровыми людьми (рис. 1).

Microbial metabolism and homeostasis.

The constant presence of a huge number of saprophytic and opportunistic microorganisms in the human body is associated with their metabolic activity, prompting natural interest due to the possible interference of bacterial products with the metabolic processes of the host [1–5]. This issue becomes especially important when dealing with intensive care patients whose survival directly depends on adequate correction of metabolic disorders. The ontogenetic mechanisms of microbiota participation in regulation and maintenance of the human internal environment have been intensely studied, but still are underestimated in the protocols of intensive treatment of critical conditions [5]. International projects for studying the human microbiome have confirmed that bacteria inhabit all open epithelial surfaces, but the main bacterial community resides in the gut. The total number of bacteria in the microbiome is 10–100 times higher than that of human cells, and the number of intestinal microbiota genes is 150 times higher than that of human genes [2, 3]. Currently, the intestinal microbiota can be studied in detail by metagenomic sequencing using 16S ribosomal RNA (rRNA) determination [6]. Ironically, the deeper is our knowledge of the microbiome, the more is the impression of the immensity and incomprehensibility of the «micro-universe» residing inside a human being. Sometimes clinicians are scared away by the complexity of microbiome research, which in practice does not encourage new solutions. Our aims were to simplify the understanding of metabolic integration processes and to maximize the practical implications of key microbial metabolites detection, including their use in the optimization of clinical nutrition.

The nutrient metabolism in the gastrointestinal tract is a multistage process depending on many factors, which are significantly altered and fundamentally different in the critically ill patients as compared to healthy people (Fig. 1).

More interestingly, the blood concentration of microbial metabolites in healthy persons is quite stable regardless of sex, age, season and diet. This has been demonstrated with aromatic microbial metabolites (phenylcarboxylic acids) in a study with over 70 healthy donors [7]. This fact supports the existence of mechanisms maintaining the stable concentrations of microbial metabolites in the systemic blood flow and, consequently, their significance for the macroorganism.

Microbial metabolites are actively involved in maintaining homeostasis of a healthy human, including endocrine regulation and immune adaptation to microbial loads [8–13]. The role of microbiota metabolites in various diseases has been intensively studied in recent years. This issue has been brought to the attention of specialists in various fields of medicine due to the potential possibility of control-

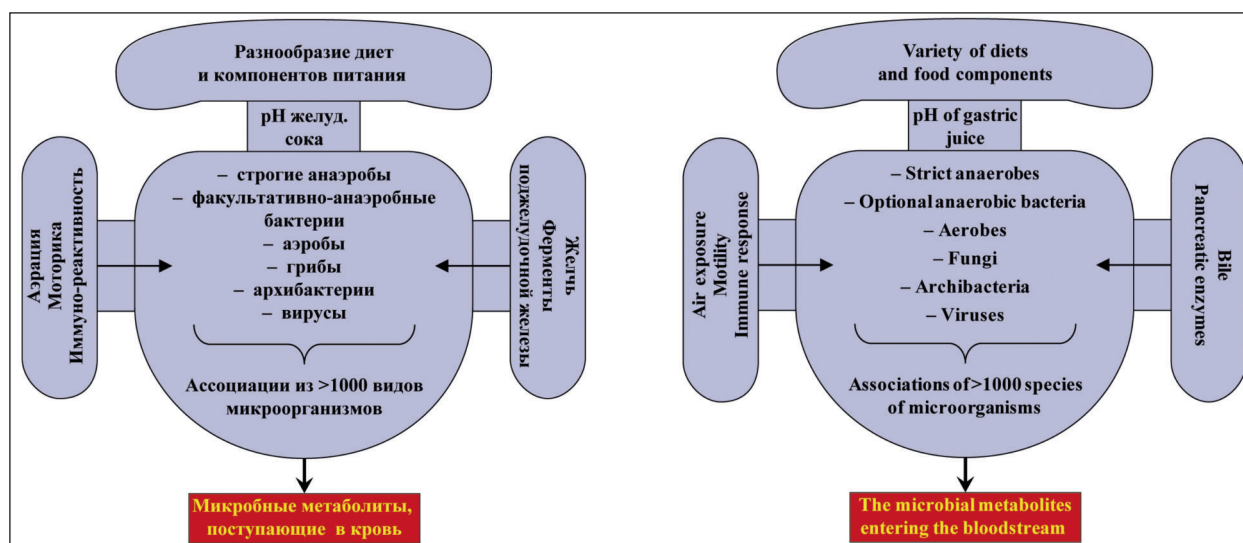


Рис. 1. Факторы, влияющие на метаболизм микробиоты в желудочно-кишечном тракте человека.
Fig. 1. Factors affecting microbiota metabolism in the human gut.

Тем более интересно, что в крови здоровых людей концентрации микробных метаболитов достаточно стабильны у разных людей, независимо от пола, возраста, времени года и характера питания. Мы убедились в этом на примере ароматических микробных метаболитов — фенилкарбоновых кислот — при обследовании более 70 здоровых доноров [7]. Этот факт указывает на существование механизмов, обеспечивающих в норме стабильные концентрации микробных метаболитов в системном кровотоке, и, следовательно, на их значимость для макроорганизма.

Микробные метаболиты активно участвуют в поддержании гомеостаза организма здорового человека, включая эндокринную регуляцию и иммунную адаптацию к микробным нагрузкам [8–13]. Роль метаболитов микробиоты при различных заболеваниях интенсивно изучается в последние годы. Внимание специалистов в разных областях медицины к этому вопросу связано потенциальной возможностью управлять патологическим процессом опосредовано через микробиоту, с новыми возможностями в лечении [14].

В данной статье обсуждается вопрос, почему нужно изучать механизмы действия и учитывать метаболизм микробиоты в организме тяжело-больного пациента, и каким образом специалисты в области клинического питания могут принять в этом самое активное участие.

В качестве введения предлагается рассмотреть рис. 2, который условно можно назвать иерархией метаболитов. Не нем показаны единицы измерения метаболитов, концентрации которых в крови человека различаются на порядки.

ling the pathological process indirectly through microbiota, with new treatment options [14].

This article provides rationale for exploring the mechanisms of action and metabolism of the microbiota in critically ill patients, as well as the role of clinical nutrition experts in the patient management.

The basic information is shown in Fig. 2, depicting the hierarchy of metabolites and different magnitudes of metabolite concentration values in human blood.

Obviously, hormones are found in the blood at very low concentrations (in $\mu\text{g/l}$, ng/l , pg/l), compared to other metabolites. Apparently, other compounds measured in micrograms and nanograms should not be considered as substrates, but as signal molecules with more regulatory functions. Looking ahead, we would like to draw attention to the fact that aromatic microbial metabolites (AMMs) also belong to this group, which will be discussed in more detail below.

This article is not a classic topic-specific review of literature. The text includes postulates based, in particular, on the results of our own research. The readers' attention is drawn to the facts and contradictions that have become quite common in the critical medicine, but remain unexplained from the traditional human biochemistry viewpoint.

On hypermetabolic-hypercatabolic syndrome. Undoubtedly, treatment of critical conditions associated with organ dysfunction and life-threatening metabolic disorders is complex and multifaceted. There are more questions than answers in the debate about nutrient support in sepsis and multiple organ failure [15]. In the fundamental intensive care manuals, the authors often make apparently contradictory statements. For example, in monographs or textbooks on intensive care

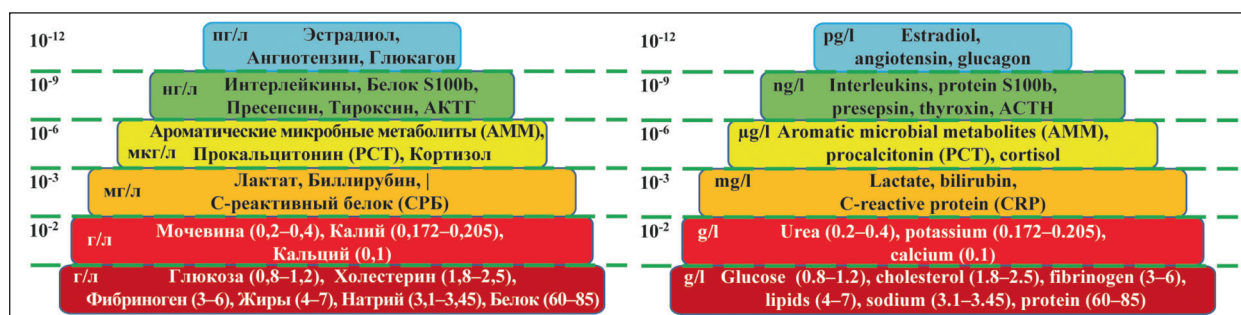


Рис. 2. Сравнение некоторых биохимических показателей, метаболитов и гормонов по уровню измерения в крови.
Fig. 2. Comparison of blood levels of some clinical chemistry parameters, metabolites and hormones.

Наглядно показано, что, по сравнению с другими метаболитами, гормоны обнаруживаются в крови в очень низких концентрациях (в мкг/л, нг/л, пг/л). По-видимому, и другие соединения, измеряемые в микрограммах и нанogramмах, следует рассматривать не как субстраты, а как сигнальные молекулы, обладающие скорее регуляторными функциями. Несколько забежая вперед, хочется обратить внимание, что к этой группе принадлежат и ароматические метаболиты микробного происхождения (АММ), о чем подробнее будет сказано ниже.

Данная статья не является классическим тематическим обзором литературы. В текст включены постулаты, сформулированные, в том числе, на основе результатов собственных исследований. Внимание читателей сфокусировано на явлениях и противоречиях, которые стали практически привычными в медицине критических состояний, но остались необъясненными с позиций традиционной биохимии человека.

О синдроме гиперметаболизма — гиперкатаболизма. Безусловно, проблема лечения критических состояний, сопровождающихся органными дисфункциями и жизнеугрожающими метаболическими нарушениями, сложна и многогранна. В дискуссии о нутритивной поддержке при сепсисе и полиорганной недостаточности больше вопросов чем ответов [15]. В фундаментальных трудах по реаниматологии авторы нередко констатируют на первый взгляд довольно противоречивые явления. Например, в монографиях или учебниках по интенсивной терапии стала привычной такая формулировка метаболических процессов как синдром гиперметаболизма — гиперкатаболизма.

Такая противоположная (можно сказать — взаимоисключающая) направленность метаболических процессов, которая регистрируется у пациентов как ответ на повреждения различной этиологии, объясняется дисрегуляторными изменениями в системе «анаболизм-катаболизм», резким увеличением потребности в

metabolic processes in critical illness are commonly called «hypermetabolic-hypercatabolic syndrome».

This contrasting (if not mutually exclusive) orientation of metabolic processes seen in patients as a response to various injuries, can be explained by dysregulatory changes in the system of «anabolism-catabolism», a sharp increase in the need for energy and plastic material donors, an increase in energy demand combined with the pathological tolerance of the tissues to «common» nutrients [16, 17]. Severe protein-energy deficit resistant to standard nutritive therapy develops, which can lead to cachexia and death of the patient [18, 19].

If we consider this process from the standpoint of microbiota concept, we should postulate that in critical conditions of abnormal microcirculation, temperature, and gas exchange of mucous membranes, enterocytes and adhesive symbiotes suffer from malnutrition, and numerous types of bacteria can be lost [5, 20, 21]. The abrupt reduction of the microbiota species composition leads to the breakdown of the «metabolic conveyor» of normal biodegradation of substrates (nutrients) [22].

Postulate 1. *The development of critical illness along with the other disorders is accompanied by a dramatic deterioration of the microbiotic environment. Bacteria have much more developed adaptation mechanisms than eukaryotes, they «switch» metabolic processes to meet their needs, which leads to the anabolic-catabolic imbalance in the host.*

Notably, nothing of the kind happens in case of simple starvation, when the organism simply does not get the necessary nutrients. In case of starvation (with preserved microbiota!), an adequate adaptation reaction of the organism is implemented: the resting energy consumption is reduced, gluconeogenesis processes are slowed down, protein catabolism is reduced. In a common starvation case, lipids are the main sources of energy, and the body weight decreases gradually, without the dramatic disturbances in systems and organs, to reasonable limits, naturally.

QUESTION: What is the fundamental difference between these two examples: simple starvation and critical illness?

донаторах энергии и пластического материала, ростом энергопотребности с параллельным развитием патологической толерантности тканей организма к «обычным» нутриентам [16, 17]. Развивается тяжелая белково-энергетическая недостаточность, резистентная к стандартной нутритивной терапии, что может привести к кахексии и гибели пациента [18, 19].

Если рассмотреть этот процесс с позиций знаний о микробиоте, следует постулировать, что при критических состояниях в условиях нарушения микроциркуляции, температуры и газообмена слизистых страдает питание энтероцитов и адгезированных симбионтов, происходит выпадение многочисленных видов бактерий [5, 20, 21]. Резкое упрощение видового состава микробиоты приводит к поломке «метаболического конвейера» нормальной биодеградации субстратов (нутриентов) [22].

Постулат первый. Развитие критического состояния наряду с известными нарушениями в организме человека сопровождается резким ухудшением среды обитания для микробиоты. Бактерии обладают значительно более развитыми механизмами адаптации по сравнению с эукариотами, они «переключают» метаболические процессы для удовлетворения своих потребностей, что приводит к дисбалансу процессов анаболизма и катаболизма в организме хозяина.

Важно отметить, что ничего подобного не происходит при простом голодании, когда организм просто не получает необходимые ему нутриенты. При голодании (в условиях сохраненной микробиоты!) реализуется адекватная адаптационная реакция организма: снижается энергопотребность покоя, замедляются процессы глюконеогенеза, уменьшается распад белков. При обычном голодании в качестве основных источников энергии выступают липиды, происходит постепенное снижение массы тела — без катастрофических нарушений в системах и органах, разумеется — до разумных пределов.

ВОПРОС: Чем же принципиально различаются эти два примера — простое голодание от критического состояния?

ОТВЕТ: дефицит нутриентов при сохраненной микробиоте приводит лишь к «перестройке» метаболического реактора в интересах организма хозяина. При критическом состоянии в условиях гибели нормальной микробиоты выжившие, метаболически-чужеродные виды бактерий (всем известные так называемые возбудители инфекционных осложнений — псевдомонады, ацинетобактеры, клебсиеллы и др.), пытаясь колонизировать слизистые, активируют другие метаболические пути, инициируют распад белков, биотрансформацию аминокис-

ANSWER: Nutrient deficiency with the preserved microbiota leads only to «rearrangement» of the metabolic reactor according to the host's interests. In a critical illness, when the normal microbiota is lost, the surviving, metabolically aggressive types of bacteria (the infectious agents such as *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Klebsiella* spp., etc.), while trying to colonize the mucous membranes, activate other metabolic pathways, initiate the protein catabolism, biotransformation of amino acids (glutamine, alanine, glycine, etc.) for the synthesis of polysaccharide matrix (biofilm). Biofilms are vital for bacteria to control the host organism through biologically active metabolites and survive the antibacterial therapy [14, 23].

On hyperglycemia. Another controversial metabolic abnormality in critical conditions is hyperglycemia, when, against logic, both glycogenolysis and gluconeogenesis increase simultaneously. The increased production of glucose by hepatocytes (from lactate, glutamine, alanine, glycine, serine, glycerol) is not accompanied by insulin synthesis [16]. Hyperglycemia is spontaneous, unstable, and difficult to correct, and its high variability may increase mortality, even in patients with average glucose levels [24]. The administration of exogenous glucose with insulin does not affect the rate of biochemical reactions [25–27], whereas intensive control of glucose is associated with almost 4-fold increase in the risk of hyperglycemia [28–30].

This phenomenon cannot be attributed to the compensatory reactions of the macroorganism, especially since hyperglycemia is associated with serious complications [31], and severe hypoglycemia is an independent risk factor of death [32, 33]. The failure of regulation mechanisms, interference of «outside force», namely, a huge starving army of bacteria, for which glucose is the most important substrate (see above), can clearly be seen. To prove and find ways to eliminate this failure, it is necessary to identify those microbial metabolites which specifically block certain enzymes and disrupt the coordinated work of biochemical cycles in the liver. This is a matter of the nearest future [34, 35].

On amino acids. In critical illness, due to the activation of the alanine-glucose-6-phosphate cycle, amino acids are mobilized from skeletal muscles and transported to the liver for glucose synthesis [16, 36, 37]. Since in hyperglycemia (see above) the patient's body is not «interested» in activation of gluconeogenesis, the microbiota again acts as a «client» ordering the accelerated muscle proteolysis [38–40]. As indirect evidence, the non-uniform utilization of amino acids from the blood can be expected, i.e. the level of those amino acids that are of particular interest to bacteria will decrease most intensively. This can be easily confirmed by studying the aminograms of patients with sepsis. The decrease in the levels of such

лот (глутамин, аланин, глицин и др.) для синтеза полисахаридного матрикса (биопленок). Биопленки жизненно необходимы бактериям для реализации механизмов влияния на организм хозяина через биологически-активные метаболиты, в том числе — для выживания под давлением антибактериальной терапии [14, 23].

О гипергликемии. Еще одним противоречивым фактом нарушения обмена при критических состояниях является развитие гипергликемии, когда вопреки логике одновременно увеличивается активность и гликогенолиза, и глюконеогенеза. Повышенная продукция гепатоцитами глюкозы (из таких субстратов глюконеогенеза как лактат, глутамин, аланин, глицин, серин, глицерол) не сопровождается синтезом инсулина [16]. Гипергликемия носит спонтанный, нестабильный характер, трудно поддается коррекции, а высокая вариабельность гликемии может увеличить смертность, даже у пациентов со средним уровнем глюкозы [24]. Ведение экзогенной глюкозы с инсулином не влияет на скорость биохимических реакций [25–27], а интенсивный контроль уровня глюкозы почти 4-кратно увеличивает риск развития гипергликемии [28–30].

Невозможно объяснить это явление целесообразностью компенсаторных реакций макроорганизма, тем более что гипергликемия чревата развитием серьезных осложнений [31], а тяжелая гипогликемия независимо связана с риском летального исхода [32, 33]. Явно просматривается сбой механизмов регуляции, вмешательство «сторонней силы», а именно — огромной голодающей армии бактерий, для которой глюкоза является важнейшим субстратом (см выше). Чтобы доказать и найти способы устранения этого сбоя, необходимо выявить те микробные метаболиты, которые точно блокируют определенные ферменты и нарушают слаженную работу биохимических циклов в печени; это дело самого ближайшего будущего [34, 35].

Об аминокислотах. Описано, что при критических состояниях вследствие активации цикла аланин-глюкоза-6-фосфат аминокислоты мобилизуются из скелетной мускулатуры и транспортируются в печень для синтеза глюкозы [16, 36, 37]. Поскольку в условиях гипергликемии (см выше) больной организм пациента совсем «не «заинтересован» в активации глюконеогенеза, в качестве «заказчика» прогрессирующего мышечного протеолиза снова выступает микробиота [38–40]. В качестве косвенного доказательства можно ожидать, что при этом из крови аминокислоты будут утилизироваться неравномерно, то есть наиболее интенсивно будет снижаться уровень тех аминокислот, в которых особенно заинтересованы бактерии. В

amino acids as glutamine, alanine, glycine, etc. is invariably registered in sepsis, while blood concentrations of aromatic amino acids remain unchanged and even tend to rise [36, 41, 42].

On catecholamines. When the normal microbiota is lost and replaced by opportunistic bacteria, the microbial biotransformation of tyrosine is disturbed, and at the same time intermediate metabolites are accumulated in the blood, which negatively affects the metabolic pathway of catecholamine synthesis. Interference of bacterial metabolites into the host metabolism contributes to the development of arterial hypotension and septic shock, which was previously described in detail in our paper [43].

On mitochondria and energy deficiency. The condition of these intracellular organelles determines the energy supply of organ cells and their performance. The abnormal function of organs in critical conditions was found to be largely determined by mitochondrial dysfunction [44–46]. However, the research has shown that low molecular weight biologically active substances produced by bacteria can affect the activity of mitochondria, their shape, size, and function. Data on the effect of microbial metabolites on the activity of enzymes involved in the regulation of protein expression and modification in the human body have been accumulating. Short-chain fatty acids and phenolic acids were found to act as inhibitors of deacetylation reactions, causing hyperacetylation, and thus inhibiting the functions of a number of proteins and enzymes [47,48]. Reversible acetylation of proteins and enzymes is one of the mechanisms for controlling the metabolic activity of cells, which is responsible for both deterioration and restoration of the organ functions. Sixty three percent of proteins localized in mitochondria are known to contain acetylated sites. In addition to activity modulation, acetylation affects such properties as protein interactions, stabilization, conformation, and subcellular protein localization. Among the mitochondrial enzymes which undergo acetylation, succinate dehydrogenase (SDH), glutamate dehydrogenase, isocitrate dehydrogenase, fatty acid oxidation enzymes, and some respiratory chain complexes subunits have been identified [49, 50]. As already mentioned, these reactions involve microbial metabolites, i.e. short-chain fatty and phenolic acids.

The «invisible organ» concept. A simple mathematical calculation gives an idea of the significance of the microbiota in the human body in numerical terms, regardless of its functional value. The total weight of trillions of bacteria that make up the human microbiota is comparable, if not greater, to that of the main vital organs (Table 1).

The significance of microbiota metabolism cannot be overestimated if their collaboration with mitochondria is admitted. Each cell contains hundreds and thousands of mitochondria, which represent up to 25% of the total volume of the cell. The

этом легко убедиться, анализируя аминокислоты пациентов с сепсисом: при сепсисе неизменно регистрируется снижение уровней таких аминокислот как глутамин, аланин, глицин и др., при этом концентрации ароматических аминокислот сохраняются и даже имеют тенденцию к накоплению в крови [36, 41, 42].

О катехоламинах. Показано, что в условиях деструкции нормального состава микробиоты и ее замещения условно-патогенными бактериями микробная биотрансформация тирозина нарушается, при этом в крови накапливаются образуются промежуточные метаболиты, которые негативно влияют на метаболический путь синтеза катехоламинов. Такое вмешательство метаболитов бактерий в метаболизм макроорганизма способствует развитию артериальной гипотензии и септического шока, что ранее детально описано в нашей статье [43].

О митохондриях и энергетической недостаточности. От состояния этих внутриклеточных органелл зависит энергетическое обеспечение клеток органов и выполнение ими соответствующих функций. Оказалось, что нарушения функции органов при критических состояниях во многом определяются митохондриальной дисфункцией [44–46]. В то же время, исследования показали, что продуцируемые бактериями низкомолекулярные биологически активные соединения способны влиять на активность митохондрий, их форму, размеры и функции. Накапливаются данные о влиянии микробных метаболитов на активность ферментов, участвующих в регуляции экспрессии и модификации белков в организме человека. Обнаружено, что короткоцепочечные жирные кислоты и фенольные кислоты действуют как ингибиторы реакций деацетилирования, вызывая гиперацетилирование, и тем самым ингибирование функций ряда белков и ферментов [47, 48]. Обратимое ацетилирование белков и ферментов является одним из механизмов контроля метаболической активности клеток, следовательно — одним из механизмов развития органных дисфункций и, напротив, восстановления функции органов. Известно, что 63% белков, локализованных в митохондриях, содержат ацетилированные сайты. Кроме модуляции активности, ацетилирование влияет на такие свойства как межбелковые взаимодействия, стабилизация, конформация и субклеточная локализация белка. Среди митохондриальных ферментов, которые подвергаются ацетилированию, известны сукцинатдегидрогеназа (СДГ), глутаматдегидрогеназа, изоцитратдегидрогеназа, ферменты окисления жирных кислот, некоторые субъединицы комплексов

total weight of trillions of mitochondria is apparently impossible to estimate, since mitochondria are extremely lively and mobile organelles that are rapidly dividing and being destroyed in response to changes in the cell's energy demand [51–53].

Postulate 2. *Human microbiota and mitochondria are functionally interrelated. Together they form an «invisible organ» responsible for the metabolic and energetic homeostasis of the body as a whole.*

This «invisible organ» has a number of distinct differences from other human organs, namely: both mitochondria and bacteria have their own unique genetic apparatus (DNA) and protein-synthetic system (ribosomes). These characteristics make it possible to switch the metabolism «to itself and against the host» both for bacteria and mitochondria under unfavorable conditions and in case of severe homeostasis disturbances [14].

The functional unification of trillions of microbial cells and intracellular organelles into a single organ is associated with their common ontogenetic origin [54]. The progenitors of mitochondria were found to be related to bacteria that integrated into eukaryotic cells in prehistoric times. Presumably, these were alpha-proteobacteria of the *Rickettsia*, *Ehrlichia* or *Anaplasma* spp. During the evolution process, they lost their autonomy by transferring some of their genes to the nucleus of the cell and became a cellular organelle [55]. The existing functional relation between mitochondria and microbiota is assured by bacterial exometabolites, which selectively, under strict liver control, enter the systemic blood flow and act as signal molecules [44].

On organ dysfunction. The organ dysfunction in a critical patient most often indicates a septic process [56]. Abnormal function of an organ is determined by individual features, hereditary predisposition, preexisting illnesses, etc. In sepsis, one or multiple organs with numerous variants can be involved in the pathological process. Many authors, emphasizing the role of intestinal microbiota, call the intestine «a motor» of multiple organ dysfunction [56–59].

According to the current (2016) international classification «SEPSIS-3» [60], the dysfunction of two or more organs must be documented for the diagnosis of sepsis.

However, the microbiota is not even mentioned in the list of organs and systems either in the Sepsis 3 classification or in the organ dysfunction severity assessment scales (SOFA, MODS, etc.). Meanwhile, this «invisible organ» dysfunction is the most important pathogenetic component in the development of sepsis. In the last few years, the understanding of significance of the microbiota has led to an overwhelming growth of publications in various medical areas [12, 13, 40, 61–67]. Despite the fact that the term «microbiota» is a relatively

дыхательной цепи [49, 50]. Как уже было сказано, в этих реакциях участвуют метаболиты микробного происхождения — короткоцепочечные жирные и фенольные кислоты.

Концепция о «невидимом органе». Простой математический подсчет дает представление о значимости микробиоты в организме человека в числовом выражении, даже если опустить за скобки ее функциональное значение. Совокупность триллионов бактерий, составляющих микробиоту человека, по своему весу сопоставима и даже превышает вес основных жизненно-важных органов (табл. 1).

Трудно переоценить, насколько значимость метаболизма микробиоты возрастает, если допустить их совместное функционирование с митохондриями. В каждой клетке содержится сотни и тысячи митохондрий, объем которых составляет до 25% от общего объема клетки. Суммарный вес триллионов митохондрий, по-видимому, невозможно оценить, так как митохондрии — чрезвычайно живые и подвижные органеллы, быстро делящиеся и разрушающиеся в ответ на изменения энергетической потребности клетки [51–53].

Постулат второй. *Микробиота и митохондрии человека функционально взаимосвязаны. Вместе они формируют «невидимый орган», ответственный за метаболический и энергетический гомеостаз организма в целом.*

Этот «невидимый орган» обладает рядом выраженных отличий от других органов человека, а именно: и у митохондрий, и у бактерий имеется собственный, отличный от организма хозяина, генетический аппарат (ДНК) и собственная белок-синтезирующая система (рибосомы). Такие особенности позволяют в неблагоприятных условиях, при грубых нарушениях гомеостаза переключать метаболизм «на себя — против хозяина» как бактериям, так и митохондриям [14].

Функциональное объединение в единый орган триллионов микробных клеток и внутриклеточных органелл-митохондрий связано с их общим происхождением в онтогенезе [54]. Установлено, что предки митохондрий относились к бактериям, которые в доисторические времена внедрились в эукариотические клетки. Предположительно, это были альфа-протеобактерии родов *Rickettsia*, *Ehrlichia* или *Anaplasma*. В процессе эволюции они потеряли автономность, передав часть своих генов в ядро клетки, и стали клеточной органеллой [55]. Функциональная связь митохондрий с микробиотой сохранилась и обеспечивается экзометаболитами бактерий, которые избирательно, под строгим контролем печени, поступают в системный кровоток, выполняя роль сигнальных молекул [44].

Таблица 1. Весовая доля жизненно-важных органов и микробиоты в % от массы тела взрослого человека весом 70 кг (расчетные данные автора).

Table 1. Weight portion of vital organs and microbiota, % of adult body weight of 70 kg (author's estimates).

Parameters	Values of parameters, % of body weight
Kidneys	0.4
Heart	0.5
Lungs	1.4
Brain	2.1
Liver	2.4
Microbiota	1.4–2.9

Примечание. Parameters — параметры; values of — значения; body weight — вес тела; data from the reference literature — данные справочной литературы; of body weight — от массы тела; kidneys — почки; heart — сердце; lungs — легкие; brain — мозг; liver — печень; microbiota — микробиота.

new for scientists and physicians, more than 50,000 full-text articles on microbiota, including the results of randomized double-blind trials, are now available online through the PubMed query. The papers not only deal with the microbiota composition in various diseases, but also frequently address the global significance of its metabolic activity, its relation to antimicrobial therapy, complications, and adverse outcomes [68–79].

What is to be done? Postulate 3. *Treatment of a critical patient at least should not aggravate existing microbiotic abnormalities. A positive treatment result is best achieved when all the components are used to reach a balance of signal molecules of microbial origin. The treatment which does not promote the restoration of metabolomic host-microbiota balance is considered inappropriate, organ dysfunction progresses and the pathological process becomes irreversible. To ensure patient survival, control (monitoring) of the microbiota metabolic activity and its proper correction are necessary.*

Correction of the microbiotic metabolism in the critically ill patients can be challenging. First of all, it is necessary to override the long-established policy of bacterial eradication from the human body. Most international studies show that more than 70% of ICU patients receive antibiotics, and in every third case the prescribed antibiotic is either inadequate in terms of the spectrum (dose, regimen) or not indicated at all [80].

There is an intensive search for effective ways to «manage» the microbial metabolism.

The study of the metabolic activity of different types of bacteria *in vitro* has shown that some of the anaerobes in human microbiota can actively utilize intermediate (toxic) products of aromatic amino acids metabolism to the final metabolites [81]. Apparently, the deficiency of this necessary bacteria in intestinal microbiota in critical patients is one of the factors leading to excessive accumulation of «sepsis-associated» phenylcarboxylic acids in blood [82].

Об органной дисфункции. Развитие органных дисфункций у реанимационного больного чаще всего указывает на септический процесс [56]. Нарушение функции того или иного органа определяется индивидуальными особенностями, наследственной предрасположенностью, преморбидным фоном и др. При сепсисе число органов, вовлеченных в патологический процесс, а также варианты сочетаний органных дисфункций могут быть любыми. Многие авторы, подчеркивая роль микробиоты кишечника, называют кишечник мотором полиорганной дисфункции [56–59].

Согласно современной международной классификации «Сепсис-3» 2016 года [60], для постановки диагноза сепсис должна быть документирована дисфункция не менее двух органов.

Однако микробиота даже не упоминается в перечне органов и систем организма человека ни в классификации «Сепсис-3», ни в шкалах оценки тяжести органных дисфункций (SOFA, MODS и др), а ведь именно дисфункция этого «невидимого органа» — важнейшая патогенетическая составляющая в развитии сепсиса. В последние несколько лет понимание значимости микробиоты привело к лавинообразному росту публикаций в самых разных областях медицины [12, 13, 40, 61–67]. Несмотря на то, что термином «микробиота» ученые и врачи стали пользоваться сравнительно недавно, сегодня в ответ на запрос в PubMed предлагается более 50 тыс. полнотекстовых статей о микробиоте, включая результаты рандомизированных двойных слепых исследований. В работах не только обсуждается фактологический материал об особенностях состава микробиоты при различных заболеваниях, но все чаще ставится вопрос о глобальном значении ее метаболической активности, связь с антимикробной терапией, развитием осложнений и неблагоприятным исходом [68–79].

Что делать? Постулат третий. *Лечение реанимационного пациента (как минимум) не должно усугублять имеющиеся нарушения микробиоты. Положительный результат в лечении наиболее достигим при условии, когда все составляющие в терапии направлены на достижение баланса сигнальных молекул микробного происхождения. Если терапия не способствует восстановлению метаболомного баланса макроорганизма с микробиотой, она неадекватна, органые дисфункции прогрессируют и патологический процесс становится необратимым. Для выживаемости пациентов необходимы способы контроля (мониторинга) метаболической активности микробиоты и ее адекватная коррекция.*

Методы коррекции метаболизма микробиоты в организме критически больного чело-

At the beginning of the 20th century, Ilya Mechnikov pointed out the impact of substances produced by normal microflora on human life and health. Further development of his ideas has led to the creation of a group of drugs based on living normal human bacterial cultures or probiotic products. So-called useful bacteria have made their way into our lives as drugs and supplements, which is extensively covered in the literature. As for intensive care patients, the number of studies of bio preparations in ICU was significantly restricted for several objective reasons, including

- difficulty of conducting the randomized blind clinical trials in the ICU (where the risk of death is high) due to issues with gaining informed consent and other ethical aspects,
- necessity of comparable homogeneous patient groups for obtaining the objective results, which is also difficult in intensive care
- reasonable doubts about the appropriateness of using live probiotic cultures combined with antibiotic therapy
- high probability of intestinal barrier failure in critical conditions, translocation of the enterally administered probiotic bacteria into the blood with unpredictable consequences.

An additional «obstacle» for progress in this area was created by negative results of a randomized double-blind controlled trial of a lactobacillus preparation (in combination with prebiotic) in patients with pancreatic necrosis: the mortality rate in the group receiving the biologic drug was higher than in the controls [83]. This fact suggests that the prescription of biodrugs in ICU requires serious consideration and objective control.

In the last few years, the growing number of publications on the efficacy of biologics (prebiotics, probiotics, synbiotics, and metabiotics) in the ICU became available [84–88]. The literature discusses various ways, the most obvious of which is replacement therapy with probiotics, prebiotics and/or metabiotics. These approaches indeed can be considered as a component of replacement therapy, but the results obtained with the use of biologics can only be trusted if the requirements for a comparative randomized trial are met. One of the most recent meta-analyses done in 2017 [65] on the use of microbiome-oriented therapy in the perioperative period summarizes the data from 31 randomized trials with more than 3,000 participants. The best results were obtained using the so-called synbiotic therapy (probiotics together with prebiotics). A significant decrease in the frequency of wound infection, postoperative pneumonia and sepsis was shown, but none of the studies managed to alter the mortality rate. Other authors suggest the use of plant polyphenols as a substrate for the bacterial transformation into biologically active metabolites [89].

The significant abnormalities of intestinal microbiota species diversity in ICU patients obviously

века — задача не из легких. Прежде всего, нужно преодолеть устоявшуюся за многие годы установку на эрадикацию бактерий из организма человека. В большинстве международных исследований показано, что в ОРИТ более 70% пациентов получают антибиотики, при этом в каждом третьем случае назначенный антибиотик неадекватен по спектру/дозе/режиму, либо вообще не показан [80].

Идет интенсивный процесс поиска эффективных способов «дирижирования» микробным метаболизмом.

При изучении метаболической активности разных видов бактерий *in vitro* показано, что отдельные анаэробы из состава микробиоты человека способны активно утилизировать промежуточные (токсичные) продукты метаболизма ароматических аминокислот до конечных метаболитов [81]. По-видимому, дефицит таких нужных бактерий в составе микробиоты кишечника у реанимационных пациентов — один из факторов, приводящий к избыточному накоплению «сепсис-ассоциированных» фенилкарбоновых кислот в крови [82].

Еще в начале XX века И. И. Мечников обратил внимание на влияние веществ, продуцируемых нормальной микрофлорой, на жизнедеятельность и состояние здоровья организма человека. Дальнейшее развитие этих идей привело к созданию целой группы препаратов на основе живых культур бактерий нормальной микрофлоры человека или продуктов — пробиотиков. Так называемые полезные бактерии активно вошли в нашу жизнь в виде препаратов и биологических добавок, им посвящена обширная литература. Что касается реанимационных пациентов, число исследований биопрепаратов в ОРИТ было существенно лимитировано по ряду объективных причин, таких как:

- в реаниматологии при высоком риске летальности проведение сравнительных рандомизированных слепых исследований связано с трудностями получения информированного согласия и другими этическими проблемами;
- для объективизации результатов требуются сопоставимые однородные группы пациентов, что также затруднено в реаниматологии;
- правомерные сомнения в целесообразности применения живых культур пробиотиков на фоне антибиотикотерапии;
- высокая вероятность несостоятельности кишечного барьера при критических состояниях, транслокация в кровь введенных энтерально бактерий-пробиотиков с непредсказуемыми последствиями.

Дополнительным «тормозом» в развитии этого направления послужил негативный результат одного из зарубежных исследований (рандомизированное, двойное, слепое, контролируе-

need to be corrected, but how can this be done most effectively? Experts sometimes completely disagree on this issue, suggesting that efforts should be made in two quite different directions, as e.g. fecal transplantation or selective decontamination. The discussion of this problem should be revisited some time later, after the new data become available, since the effectiveness of selective decontamination has already been well studied [90–95], while the technologies of fecal transplantation are still very controversial and require a time check [96–98]. The FDA has already warned openly about the risk of transmitting dangerous bacteria with multiple antibiotic resistance to the recipient from the donor [99].

On novel antimicrobial therapy options. Traditionally, the main goal of systemic antibacterial therapy in sepsis is to eliminate the so-called pathogens that are currently dominating the infection site and directly activating the inflammatory cascade. However, it is now understood that the real goal is not limited to controlling the number of bacteria. The primary goal is to minimize the functional (metabolic) activity of dominating microbes in order to reduce the entry of «toxic» metabolites into the systemic blood flow [14]. Antimicrobial therapy aimed at the dominating pathogen should not aggravate the current abnormal function of the «invisible organ», but, on the contrary, should promote its normalization. The prospects for antibiotic therapy are to develop new treatment regimens and combinations for achieving this goal using preferably the «old» antibiotics.

The majority of antibiotics used in intensive care are beta-lactams (semi-synthetic and combined penicillins, cephalosporins of all generations, carbapenems, monobactams), and their main action mechanism is the disruption of the bacterial cell wall synthesis. The choice of antibiotics today is based solely on their ability to prevent bacterial growth/proliferation. The clinical principles of antibiotic selection today do not take into account their ability to influence the metabolic activity of specific pathogens and microbiota of the patient in general.

The metabolomic approach to sepsis and the possibility to evaluate the evolution of the process using an integral index (the level of aromatic metabolites) will make it possible to use the antimicrobial therapy regimens based on antibiotics with different mechanisms of action in the treatment of septic patients [14, 100–102]. For example, to regulate the metabolic activity of bacteria, one would need antibiotics that interfere primarily with the synthesis of microbial cell proteins, since metabolic pathways are switched with the help of enzymes of protein origin. Aminoglycosides, macrolides, tetracyclines, and levomycetin are known to have this mechanism of action, but these groups of antibi-

мое) по применению препарата на основе лакто-бактерий (в комбинации с пребиотиком) у пациентов с панкреонекрозом: летальность в группе, получающей биопрепарат, оказалась выше, чем в контроле [83]. Этот факт указывает, что назначение биопрепаратов в ОРИТ требует серьезного отношения и объективного контроля.

В последние несколько лет растет число публикаций в зарубежной литературе о положительных эффектах применения биопрепаратов: пребиотиков, пробиотиков и синбиотиков и метабиотиков в ОРИТ [84–88]. В литературе обсуждаются разные пути, наиболее очевидный из которых — заместительная терапия с применением пробиотиков, пребиотиков и/или метабиотиков. Эти технологии можно рассматривать как элемент заместительной терапии, но к результатам, полученным при использовании биопрепаратов, можно относиться с доверием лишь при условии соблюдения требований сравнительного рандомизированного исследования. В одном из последних мета-анализов 2017 г. [65] по применению микробиом-ориентированной терапии в периоперационном периоде обобщены данные 31 рандомизированного исследования, общее число включенных пациентов — более трех тысяч. Показано, что наилучшие результаты получены при использовании так называемой синбионтной терапии (пробиотики вместе с пребиотиками). Показано достоверное снижение частоты раневой инфекции, послеоперационных пневмоний и сепсиса, однако ни в одном из исследований не удалось повлиять на показатель летальности. Другие авторы предлагают применение растительных полифенолов как субстрата для трансформации бактериями в биологически-активные метаболиты [89].

Выраженные нарушения видового разнообразия кишечной микробиоты у пациентов ОРИТ, безусловно, нуждаются в коррекции, но как это сделать наиболее эффективно? В этом вопросе мнения экспертов иногда расходятся кардинально, предлагая направить усилия в двух очень разных направлениях, например, таких как фекальная трансплантация или селективная деконтаминация. К обсуждению этой проблемы целесообразно вернуться через некоторое время, после появления новых данных, так как эффективность селективной деконтаминации уже хорошо изучена [90–95], в то время как технологии фекальной трансплантации пока очень спорны, требуют проверки временем [96–98], а FDA уже открыто предупреждает о риске передачи реципиенту от донора опасных бактерий с множественной антибиотикорезистентностью [99].

О новых возможностях антимикробной терапии. Традиционно задача системной антибактериальной терапии при сепсисе направле-

otics are not popular today either in surgery or in intensive care.

We have described a novel approach to antimicrobial therapy as a targeted regulation of microbial signaling molecules. The new antibiotic therapy regimens will be oriented towards organoprotection, as the treatment guided by the monitoring of the aromatic metabolites level will allow preventing the progression and development of the organ dysfunction. Antibiotic therapy regimens for targeted regulation of microbial signaling molecules are under development and stand ready for clinical testing.

Postulate 4. *The severity of metabolic disorders associated with «invisible organ» dysfunction (microbiota and mitochondria) in intensive care patients can be evaluated objectively using blood profile of the aromatic signaling metabolites, which can be utilized as an integral indicator of metabolomic condition in sepsis.*

The strict specialization of microbiota for various biological areas (gut, oropharynx, skin, urogenital tract, etc.) and incredible variability in response to many factors (concentration of oxygen, nutrients, pH, etc.) make the study of the metabolic process particularly challenging. The study of metabolomics in sepsis revealed the most significant metabolites for sepsis [102], which can be measured as an integral indicator in the blood serum and helps control the direction of the septic process and treatment efficacy using the degree of deviation from the reference values.

Table 2 presents a brief description of four key aromatic metabolites that proved to be the most clinically, pathogenetically, and diagnostically significant among hundreds of other low-molecular substances of different classes studied [101].

Thus, microbiota dysfunction manifests, on the one hand, as an increased output of certain microbial products being a result of high microbial load combined with pathological colonization of gut by bacteria involved into the septic process. On the other hand, the microbial biodegradation of the excess hormones and other endogenous biologically active substances necessary for the homeostasis maintenance is impaired. The reason for this is a defect in the species diversity of intestinal bacteria, particularly the lack of indigenous anaerobes. The altered profile of aromatic metabolites in the blood representing multiple impaired functions of the «invisible organ» is indeed an integral indicator.

Conclusion

A novel understanding of the role of human microbiota will soon lead to a major revision of approaches to adequate compensation for energy loss and nutrient deficiencies in critical conditions. In order to increase the efficiency of patient manage-

Table 2. Key aromatic microbial metabolites used for monitoring in ICU.

Name	Abbreviation	Function under normal conditions	Changes in sepsis
Aromatic microbial metabolites	AMM	Always present in the blood, maintains the microbiome-metabolome balance	Severely impaired AMM profile
Phenylpropionic acid	PhPA	The final product of phenylalanine metabolism by anaerobic bacteria of microbiota. Lipophilic, easily penetrates into the cells and mitochondria, regulates the activity of mitochondria, increasing the active oxygen species production, modifies the thiol groups of proteins and enzymes	Absent in the blood of patients with sepsis
p-Hydroxyphenyllactic acid	pHPhLA	Hydrophilic, in low concentrations is constantly present in the blood, indicates tyrosine metabolism. Intermediate metabolite of intestinal microbiota. Maintains the microbiome-metabolome balance, has a «useful» anti-inflammatory effect similar to antiprostaglandins in the gastrointestinal tract lumen.	Significantly elevated in blood, interacts with the cell membrane, disrupts the metabolism of arachidonic acid, reduces the phagocytic activity of neutrophils, correlates with mortality.
p-Hydroxyphenylacetic acid	p-HPAA	Hydrophilic, the final product of the alternative pathway of tyrosine endogenous metabolism. Usually absent in the blood.	Together with the metabolites of its microbial biotransformation it suppresses the activity of enzymes (tyrosine hydroxylase), disrupts the synthesis of catecholamines and contributes to the development of septic shock.
Phenyllactic acid	PhLA	Lipophilic, biotransformed by intestinal microbiota into PhPA. Its excess is metabolized in the liver by conjugation.	Its elevation in the blood is a bad prognostic sign (development of liver dysfunction?)

на на элиминацию так называемых возбудителей, лидирующих в данный момент в очаге инфекции, и непосредственно реализующих активацию воспалительного каскада. Однако в настоящее время приходит понимание, что реальная цель состоит не только (а вернее, не столько) в том, чтобы повлиять на количество бактерий. Задача номер один — минимизировать функциональную (метаболическую) активность микробов-лидеров, чтобы уменьшить поступление в системный кровоток «токсичных» метаболитов [14]. Важно, чтобы антимикробная терапия, направленная на лидирующего возбудителя, не усугубляла имеющуюся дисфункцию «невидимого органа», а напротив — способствовала нормализации. Перспективы антибиотикотерапии состоят в разработке новых режимов и комбинаций, применение которых обеспечит выполнение этой задачи. В том числе — на основе «старых» антибиотиков.

Известно, что большинство антибиотиков, применяемых в реаниматологии, относятся к бета-лактамам (полусинтетические и комбинированные пенициллины, цефалоспорины всех поколений, карбапенемы, монобактамы), а основной точкой приложения их антибактериальной активности является нарушение синтеза клеточной стенки бактерий. Выбор антибиотиков сегодня строится исключительно на основе их способности предотвращать рост/размножение бактерий. При выборе антибиотиков сегодня в клинике никак не учитывается их способность влиять на метаболическую активность конкретных возбудителей и микробиоты пациента в целом.

ment and rehabilitation, the new solutions will be found for active control of metabolic processes through subordination of bacterial metabolism to the benefit of the host [103, 104]. Antibiotics and bio-drugs will be used in a targeted manner, guided by key microbial metabolites levels and using available laboratory monitoring methods. Developments in this area in the intensive care setting will have a crucial impact on the future critical care medicine.

Метаболомный подход к проблеме сепсиса и возможность оценивать динамику процесса с применением интегрального показателя (уровня ароматических метаболитов) позволит в перспективе применять в лечении септических пациентов режимы антимикробной терапии, построенные на антибиотиках с другими механизмами действия [14, 100–102]. Например, для регуляции метаболической активности бактерий понадобятся антибиотики, нарушающие прежде всего синтез белков микробной клетки, так как переключение метаболических путей происходит с участием ферментов, то есть соединений белковой природы. Как известно, этим механизмом действия обладают аминогликозиды, макролиды, тетрациклины, левомицетин, но эти группы антибиотиков сегодня как раз не популярны ни в хирургии, ни в реаниматологии.

Новый подход к антимикробной терапии назван нами целенаправленной регуляцией сигнальных молекул микробного происхождения. Новые режимы антибиотикотерапии будут направлены на реализацию принципа органопротекции, так как лечение под мониторингом

Таблица 2. Ключевые ароматические микробные метаболиты для мониторинга в ОРИТ.

Название	Аббревиатура		Функция в норме	Особенности при сепсисе
	Русск.	Англ.		
Ароматические микробные метаболиты	АММ	АММ	Всегда присутствуют в крови, обеспечивают баланс микробиома и метаболома	Профиль АММ грубо нарушен
Фенил-пропионовая кислота	ФПК	PhPA	Конечный продукт метаболизма фенилаланина анаэробными бактериями микробиоты. Липофильная — легко проникает внутрь клеток и митохондрий, регулирует активность митохондрий, повышает продукцию активных форм кислорода, способна к модификации тиоловых групп белков и ферментов	При сепсисе практически отсутствует в крови
п-Гидроксифенил-молочная кислота	п-ГФМК	p-NPhLA	Гидрофильная. В низких концентрациях всегда присутствует в крови, отражает нормальный метаболизм тирозина. Является промежуточным метаболитом при биodeградации тирозина кишечной микробиотой. Поддерживает баланс микробиома и метаболома, в просвете ЖКТ оказывает «полезный» против-воспалительный эффект по типу «анти-простагландинного»	Значительно повышена в крови, взаимодействует с мембраной клеток, нарушает метаболизм арахидоновой кислоты, снижает фагоцитирующую активность нейтрофилов, коррелирует с летальностью
п-Гидроксифенил-уксусная кислота	п-ГФУК	p-NPhAA	Гидрофильная. Конечный продукт альтернативного пути эндогенного метаболизма тирозина. Обычно отсутствует в крови.	П-ГФУК и метаболиты ее микробной биотрансформации подавляют активность ферментов (тирозин-гидроксилазу), нарушают синтез катехоламинов, способствуют развитию септического шока
Фенилмолочная кислота	ФМК	PhLA	Липофильная. Подвергается биотрансформации микробиотой кишечника до ФПК. Избыток конъюгируется в печени.	Повышение в крови — плохой прогностический признак (например, присоединение дисфункции печени)

уровня ароматических метаболитов позволит предотвратить прогрессирование уже имеющих и присоединение новых органических дисфункций у пациента. Режимы антибиотикотерапии для целенаправленной регуляции уровня сигнальных молекул микробного происхождения находятся в стадии разработки и ждут результатов клинической апробации.

Постулат четвертый. Степень метаболических нарушений, связанных с дисфункцией «невидимого органа» (микробиоты и митохондрий) у реаниматологических пациентов можно объективно оценить по профилю сигнальных метаболитов ароматического строения в крови пациента, используя его в качестве интегрального показателя состояния метаболома при сепсисе.

Трудность изучения метаболического процесса усугубляется строгой специализацией микробиоты для разных биологических ниш (кишечник, ротоглотка, кожа, урогенитальный тракт и др.) и невероятной изменчивостью в зависимости от многих факторов (концентрация кислорода, нутриентов, pH и др.). Изучение особенностей метаболома при сепсисе позволило выявить наиболее значимые для сепсиса метаболиты [102], которые можно измерять в качестве интегрального показателя дистанционно — в сыворотке крови, а по степени отклонения от референсных значений контролировать направленность септического процесса и эффективность терапии.

В табл. 2 приведена краткая характеристика четырех ключевых ароматических метаболитов, которые среди сотни изученных нами других низкомолекулярных соединений разных классов оказались наиболее клинически, патогенетически и диагностически значимыми [101].

Таким образом, дисфункция микробиоты проявляется, с одной стороны, избыточной продукцией определенных продуктов микробного происхождения — как отражение высокой микробной нагрузки (несанированный очаг) в сочетании с патологической колонизацией кишечника бактериями-участниками септического процесса. С другой стороны, нарушается такая важная функция микробиоты, необходимая для поддержания гомеостаза, как микробная биodeградация избытка гормонов и других эндогенных биологически-активных соединений. Причина — дефект видового разнообразия бактерий в кишечнике, прежде всего — дефицит индигенных анаэробов. Измененный профиль ароматических метаболитов в крови отражает нарушение и тех, и других функций «невидимого органа» — то есть действительно является интегральным показателем.

Заключение

Новый уровень знаний о роли микробиоты в организме человека уже в ближайшее время приведет к серьезному пересмотру под-

ходов к адекватной компенсации энергетических потерь и дефицита нутриентов при критических состояниях. Для повышения эффективности лечения, выхаживания и успешной реабилитации пациентов будут найдены способы активного управления метаболическими процессами через подчинение метаболизма

бактерий интересам хозяина [103, 104]. Антибиотики и биопрепараты будут применяться целенаправленно, под контролем ключевых микробных метаболитов, с использованием доступных методов лабораторного мониторинга. Перспективность развития этого направления для реаниматологии трудно переоценить.

Литература

1. *Dickson R.P.* The microbiome and critical illness. *Lancet Respir. Med.* 2016; 4 (1): 59–72. DOI: 10.1016/S2213-2600 (15)00427-0. PMID: 26700442
2. *Cho I., Blaser M.J.* The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nat. Rev. Genet.* 2012; 13 (4): 260–270. DOI: 10.1038/nrg3182. PMID: 22411464
3. *Ley R.E., Turnbaugh P.J., Klein S., Gordon J.I.* Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature.* 2006; 444 (7122): 1022–1023. DOI: 10.1038/4441022a. PMID: 17183309
4. *Porras D., Nistal E., Martínez-Flórez S., González-Gallego J., García-Mediavilla M.V., Sánchez-Campos S.* Intestinal Microbiota Modulation in Obesity-Related Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Front Physiol.* 2018; 9: 1813. DOI: 10.3389/fphys.2018.01813. PMID: 30618824
5. Чернеуская Е.А., Белобородова Н.В. Микробиота кишечника при критических состояниях (обзор). *Общая реаниматология.* 2018; 14 (5): 96–119. DOI: 10.15360/1813-9779-2018-5-96-119.
6. *Tringe S.G., Hugenholtz P.* A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. *Curr. Opin. Microbiol.* 2008; 11: 442–446. DOI: 10.1016/j.mib.2008.09.011. PMID: 18817891
7. Белобородова Н.В., Мороз В.В., Осипов А.А., Бедова А.Ю., Оленин А.Ю., Гецина М.Л., Карпова О.В., Оленина Е.Г. Нормальный уровень сепсис-ассоциированных фенолкарбоновых кислот в сыроворотке крови человека. *Биохимия.* 2015; 80 (3): 449–455. JCR IF-1,303 DOI: 10.1134/S0006297915030128. PMID: 25761691
8. *Clarke G., Stilling R.M., Kennedy P.J., Stanton C., Cryan J.F., Dinan T.G.* Minireview: Gut Microbiota: The Neglected Endocrine Organ. *Mol. Endocrinol.* 2014; 28 (8): 1221–1238. DOI: 10.1210/me.2014-1108. PMID: 24892638
9. *Hooper L.V., Macpherson A.J.* Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat. Rev. Immunol.* 2010; 10 (3): 159–169. DOI: 10.1038/nri2710. PMID: 20182457
10. *Kau A.L., Ahern P.P., Griffin N.W., Goodman A.L., Gordon J.I.* Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. *Nature.* 2011; 474 (7351): 327–336. DOI: 10.1038/nature10213. PMID: 21677749
11. *Fung T.C., Olson C.A., Hsiao E.Y.* Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease. *Nat. Neurosci.* 2017; 20 (2): 145–155. DOI: 10.1038/nn.4476. PMID: 28092661
12. *Hornung B., dos Santos V.A.P.M., Smidt H., Schaap P.J.* Studying microbial functionality within the gut ecosystem by systems biology. *Genes and Nutrition.* 2018; 13: 5. DOI: 10.1186/s12263-018-0594-6.
13. *Kim C.H.* Immune regulation by microbiome metabolites. *Immunology.* 2018; 154 (2): 220. DOI: 10.1111/imm.12930. PMID: 29569377
14. Белобородова Н.В. СЕПСИС. Метаболический подход (монография). М.: МИА; 2018: 272 с. ISBN 978-5-9986-0350-1
15. *Vincent J.L.* Metabolic support in sepsis and multiple organ failure: More questions than answers. *Crit. Care Med.* 2007; 35 (9 Suppl): S436–440. DOI: 10.1097/01.CCM.0000278601.93369.72. PMID: 17713390
16. Гельфанд Б.Р., Салтанов А.И. Интенсивная терапия: национальное руководство: в 2 т. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2009: 1744 с. ISBN 978-5-9704-0939-8
17. *Mtaueh H., Soto Aguero M.J., Campbell M.* Systematic review of factors associated with energy expenditure in the critically ill. *Clin. Nutr. ESPEN.* 2019; 33: 111–124. DOI: 10.1016/j.clnesp.2019.06.009
18. *Alverdy J.C.* Hypermetabolism and Nutritional Support in Sepsis. *Surg. Infect. (Larchmt).* 2018; 19 (2): 163–167. DOI: 10.1089/sur.2017.313. PMID: 29394142
19. *Viana M.V., Pantet O., Bagnoud G., Martinez A., Favre E., Charrière M., Favre D., Eckert P., Berge M.M.* Metabolic and Nutritional Characteristics of Long-Stay Critically Ill Patients. *J. Clin. Med.* 2019; 8 (7): 985. DOI: 10.3390/jcm8070985.
20. *Marshall J.C.* Gastrointestinal flora and its alterations in critical illness. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 1999; 2 (5): 405–411. DOI: 10.1097/00075197-199909000-00009. PMID: 10589383
21. *Blum H.E.* The human microbiome. *Adv. Med. Sci.* 2017; 62: 414–420. DOI: 10.1016/j.advms.2017.04.005. PMID: 28711782
22. *Beloborodova N.V.* Chapter 1. Interaction of host-microbial metabolism in sepsis In: Kumar V. (Ed.) *Sepsis*. Rijeka, Croatia: InTech; 2017: 3–19. DOI: 10.5772/68046 ISBN 978-953-51-3395-7. https://www.intechopen.com/books/sepsis
23. Бухарин О.В., Гинцбург А.Л., Романова Ю.М., Эль-Регистан Г.И. Механизмы выживания бактерий. М.: Медицина; 2005: 367.
24. *Hsu C.-W.* Glycemic control in critically ill patients. *World J. Crit. Care Med.* 2012; 1 (1): 31–39. DOI: 10.5492/wjccm.v1.i1.31.
25. *van den Bergh G., Wilmer A., Hermans G.* Intensive insulin therapy in the medical ICU. *N. Engl. J. Med.* 2006; 354: 449–461. DOI: 10.1016/s0084-3741 (08)70038-6

References

1. *Dickson R.P.* The microbiome and critical illness. *Lancet Respir. Med.* 2016; 4 (1): 59–72. DOI: 10.1016/S2213-2600(15)00427-0. PMID: 26700442
2. *Cho I., Blaser M.J.* The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nat. Rev. Genet.* 2012; 13 (4): 260–270. DOI: 10.1038/nrg3182. PMID: 22411464
3. *Ley R.E., Turnbaugh P.J., Klein S., Gordon J.I.* Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature.* 2006; 444 (7122): 1022–1023. DOI: 10.1038/4441022a. PMID: 17183309
4. *Porras D., Nistal E., Martínez-Flórez S., González-Gallego J., García-Mediavilla M.V., Sánchez-Campos S.* Intestinal Microbiota Modulation in Obesity-Related Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Front Physiol.* 2018; 9: 1813. DOI: 10.3389/fphys.2018.01813. PMID: 30618824
5. *Chernevskaya E.A., Beloborodova N.V.* Gut Microbiome in Critical Illness (Review). *Obshchaya Reanimatologiya—General Reanimatology.* 2018; 14(5): 96–119. [In Russ.] DOI: 10.15360/1813-9779-2018-5-96-119.
6. *Tringe S.G., Hugenholtz P.* A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. *Curr. Opin. Microbiol.* 2008; 11: 442–446. DOI: 10.1016/j.mib.2008.09.011. PMID: 18817891
7. *Beloborodova N.V., Moroz V.V., Osipov A.A., Bedova A.Yu., Olenin A.Yu., Getina M.L., Karpova O.V., Olenina E.G.* Normal level of sepsis-associated phenylcarboxylic acids in human serum. *Biokhimiya.* 2015; 80 (3): 449–455. [In Russ.] JCR IF-1,303 DOI: 10.1134/S0006297915030128. PMID: 25761691
8. *Clarke G., Stilling R.M., Kennedy P.J., Stanton C., Cryan J.F., Dinan T.G.* Minireview: Gut Microbiota: The Neglected Endocrine Organ. *Mol. Endocrinol.* 2014; 28 (8): 1221–1238. DOI: 10.1210/me.2014-1108. PMID: 24892638
9. *Hooper L.V., Macpherson A.J.* Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat. Rev. Immunol.* 2010; 10 (3): 159–169. DOI: 10.1038/nri2710. PMID: 20182457
10. *Kau A.L., Ahern P.P., Griffin N.W., Goodman A.L., Gordon J.I.* Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. *Nature.* 2011; 474 (7351): 327–336. DOI: 10.1038/nature10213. PMID: 21677749
11. *Fung T.C., Olson C.A., Hsiao E.Y.* Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease. *Nat. Neurosci.* 2017; 20 (2): 145–155. DOI: 10.1038/nn.4476. PMID: 28092661
12. *Hornung B., dos Santos V.A.P.M., Smidt H., Schaap P.J.* Studying microbial functionality within the gut ecosystem by systems biology. *Genes and Nutrition.* 2018; 13: 5. DOI: 10.1186/s12263-018-0594-6.
13. *Kim C.H.* Immune regulation by microbiome metabolites. *Immunology.* 2018; 154 (2): 220. DOI: 10.1111/imm.12930. PMID: 29569377
14. *Beloborodova N.V.* SEPSIS. The metabolomic approach. (monography). M.: MIA; 2018: 272 p [In Russ.]. ISBN 978-5-9986-0350-1
15. *Vincent J.L.* Metabolic support in sepsis and multiple organ failure: More questions than answers. *Crit. Care Med.* 2007; 35 (9 Suppl): S436–440. DOI: 10.1097/01.CCM.0000278601.93369.72. PMID: 17713390
16. *Gelfend B.R., Saltanov A.I.* Intensive therapy: national guideline: in 2 vol. M.: GEOTAR-Media; 2009: 1744 p. [In Russ.]. ISBN 978-5-9704-0939-8
17. *Mtaueh H., Soto Aguero M.J., Campbell M.* Systematic review of factors associated with energy expenditure in the critically ill. *Clin. Nutr. ESPEN.* 2019; 33: 111–124. DOI: 10.1016/j.clnesp.2019.06.009
18. *Alverdy J.C.* Hypermetabolism and Nutritional Support in Sepsis. *Surg. Infect. (Larchmt).* 2018; 19 (2): 163–167. DOI: 10.1089/sur.2017.313. PMID: 29394142
19. *Viana M.V., Pantet O., Bagnoud G., Martinez A., Favre E., Charrière M., Favre D., Eckert P., Berge M.M.* Metabolic and Nutritional Characteristics of Long-Stay Critically Ill Patients. *J. Clin. Med.* 2019; 8 (7): 985. DOI: 10.3390/jcm8070985.
20. *Marshall J.C.* Gastrointestinal flora and its alterations in critical illness. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 1999; 2 (5): 405–411. DOI: 10.1097/00075197-199909000-00009. PMID: 10589383
21. *Blum H.E.* The human microbiome. *Adv. Med. Sci.* 2017; 62: 414–420. DOI: 10.1016/j.advms.2017.04.005. PMID: 28711782
22. *Beloborodova N.V.* Chapter 1. Interaction of host-microbial metabolism in sepsis In: Kumar V. (Ed.) *Sepsis*. Rijeka, Croatia: InTech; 2017: 3–19. DOI: 10.5772/68046 ISBN 978-953-51-3395-7. https://www.intechopen.com/books/sepsis
23. *Bukharin O. V., Ginzburg A. L., Romanova Yu. M., El-Registan G. I.* Mechanisms of bacterial survival. M.: Medicina; 2005: 367 [In Russ.].
24. *Hsu C.-W.* Glycemic control in critically ill patients. *World J. Crit. Care Med.* 2012; 1 (1): 31–39. DOI: 10.5492/wjccm.v1.i1.31.
25. *van den Bergh G., Wilmer A., Hermans G.* Intensive insulin therapy in the medical ICU. *N. Engl. J. Med.* 2006; 354: 449–461. DOI: 10.1016/s0084-3741 (08)70038-6

Reviews

26. Orford N.R. Intensive insulin therapy in septic shock. *Crit. Care Resusc.* 2006; 8 (3): 230–234. PMID: 16930111
27. Farrokhi F, Smiley D., Umpierrez G.E. Glycemic control in non-diabetic critically ill patients. *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2011; 25 (5): 813–824. DOI: 10.1016/j.beem.2011.05.004. PMID: 21925080
28. Yamada T., Shojima N., Noma H., Yamauchi T., Kadowaki T. Glycemic control, mortality, and hypoglycemia in critically ill patients: a systematic review and network meta-analysis of randomized controlled trials. *Intensive Care Med.* 2017; 43: 1–15. DOI: 10.1007/s00134-016-4523-0.
29. Yatabe T., Inoue S., Sakaguchi M, Egi M. The optimal target for acute glycemic control in critically ill patients: a network meta-analysis. *Intensive Care Med.* 2017; 43: 16–28. DOI: 10.1007/s00134-016-4558-2.
30. Fu Y., Sun Y., Zhang J., Cheng Y. Intensive glucose control for critically ill patients: an updated meta-analysis. *Endocr. Connect.* 2018; 7 (12): 1288–1298. DOI: 10.1530/EC-18-0393. PMID: 30352416
31. Krinsley J. Association between hyperglycemia and increased hospital mortality in a heterogeneous population of critically ill patients. *Mayo Clin. Proc.* 2003. 78 (12): 1471–1478. DOI: 10.4065/78.12.1471. PMID: 14661676
32. Krinsley J.S., Grover A. Severe hypoglycemia in critically ill patients: risk factors and outcomes. *Crit. Care Med.* 2007; 35: 2262–2267. DOI: 10.1097/01.CCM.0000282073.98414.4B. PMID: 17717490
33. Clain J., Ramar K., Surani S.R. Glucose control in critical care. *World J Diabetes.* 2015; 6 (9): 1082–1091. DOI: 10.4239/wjd.v6.i9.1082. PMID: 26265994
34. Han H., Li Y., Fang J., Liu G., Yin J., Li T., Yin Y. Gut microbiota and type 1 diabetes. *Int. J. Mol. Sci.* 2018; 19 (4): 995. DOI: 10.3390/ijms19040995. PMID: 29584630
35. Zhao L., Zhang F., Ding X., Wu G., Lam Y.Y., Wang X., Fu H., Xue X., Lu C., Ma J., Yu L., Xu C., Ren Z., Xu Y., Xu S., Shen H., Zhu X., Shi Y., Shen Q., Dong W., Liu R., Ling Y., Zeng Y., Wang X., Zhang Q., Wang J., Wang L., Wu Y., Zeng B., Wei H., Zhang M., Peng Y., Zhang C. Gut bacteria selectively promoted by dietary fibers alleviate type 2 diabetes. *Science.* 2018; 359 (6380): 1151. DOI: 10.1126/science.aao5774. PMID: 29590046
36. Hirose T., Shimizu K., Ogura H., Tasaki O., Hamasaki T., Yamano S., Ohnishi M., Kuwagata Y., Shimazu T. Altered balance of the amino-gram in patients with sepsis – the relation to mortality. *Clin. Nutr.* 2014; 33 (1): 179–182. DOI: 10.1016/j.clnu.2013.11.017. PMID: 24377412
37. Carro M.L.F. Proteins, Catabolism and Sepsis: A Literature Review. *EC Nutrition.* 2018; 13.3: 126–134.
38. Nyangale E.P., Mottram D.S., Gibson G.R. Gut microbial activity, implications for health and disease: The potential role of metabolite analysis. *J. Proteome Res.* 2012; 11 (12): 5573. DOI: 10.1021/pr300637d. PMID: 23116228
39. Bröer S., Bröer A. Amino acid homeostasis and signalling in mammalian cells and organisms. *Biochem J.* 2017; 474 (12): 1935–1963. DOI: 10.1042/BCJ20160822. PMID: 28546457
40. Sitkin S.I., Vakhitov T.Y., Demyanova E.V. Microbiome, gut dysbiosis and inflammatory bowel disease: That moment when the function is more important than taxonomy. *Almanac of Clinical Medicine.* 2018; 46 (5): 396. DOI: 10.18786/2072-0505-2018-46-5-396-425.
41. Su L., Li H., Xie A., Liu D., Rao W., Lan L., Li X., Li F., Xiao K., Wang H., Yan P., Li X., Xie L. Dynamic changes in amino acid concentration profiles in patients with sepsis. *PLoS One.* 2015; 10 (4): e0121933. DOI: 10.1371/journal.pone.0121933. PMID: 25849571
42. Gunst J., Vanhorebeek L., Thiessen S.E., Van den Bergh G. Amino acid supplements in critically ill patients. *Pharmacol. Res.* 2018; 130: 127–131. DOI: 10.1016/j.phrs.2017.12.007. PMID: 29223645
43. Beloborodova N.V., Sarshor Yu.N., Bedova A.Yu., Chervenskaya E.A., Pautova A.K. Involvement of Aromatic Metabolites in the Pathogenesis of Septic Shock. *Shock.* 2018; 50 (3): 273–279. DOI: 10.1097/SHK.0000000000001064. PMID: 29189605
44. Федотчева Н.И., Литвинова Е.Г., Осипов А.А., Оленин А.Ю., Мороз В.В., Белобородова Н.В. Влияние микробных метаболитов фенольной природы на активность митохондриальных ферментов. *Биофизика.* 2015; 60 (6): 1118–1124.
45. Mottauea W., Chiang C.-K., Mühlbauer M., Starr A.E., Butcher J., Abujamel T., Deeke S.A., Brandel A., Zhou H., Shokrala S., Hajibabaei M., Singleton R., Benchimol E.L., Jobin C., Mack D.R., Figeys D., Stintzi A. Altered intestinal microbiota–host mitochondria crosstalk in new onset Crohn's disease. *Nat. Commun.* 2016; 7: 13419. DOI: 10.1038/ncomms13419.
46. Franco-Oregon A., Gilbert J.A. The Microbiome-Mitochondrion connection: Common Ancestries, Common Mechanisms, Common Goals. *mSystems.* 2017; 2 (3): e00018-17. DOI: 10.1128/mSystems.00018-17. PMID: 28497122
47. Waldecker M., Kautenburger T., Daumann H., Busch C., Schrenk D. Inhibition of histone-deacetylase activity by short-chain fatty acids and some polyphenol metabolites formed in the colon. *J. Nutr. Biochem.* 2008; 19 (9): 587–593. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2007.08.002. PMID: 18061431
48. Kaelin W.G.Jr., McKnight S.L. Influence of metabolism on epigenetics and disease. *Cell.* 2013; 153 (1): 56–69. DOI: 10.1016/j.cell.2013.03.004. PMID: 23540690
49. Baeza J., Smallegan M.J., Denu J.M. Mechanisms and Dynamics of Protein Acetylation in Mitochondria. *Trends Biochem. Sci.* 2016; 41 (3): 231–244. DOI: 10.1016/j.tibs.2015.12.006. PMID: 26822488
50. Menzies K.J., Zhang H., Katsyuba E., Auwerx J. Protein acetylation in metabolism — metabolites and cofactors. *Nat Rev Endocrinol.* 2016; 12 (1): 43–60. DOI: 10.1038/nrendo.2015.181. PMID: 26503676
26. Orford N.R. Intensive insulin therapy in septic shock. *Crit. Care Resusc.* 2006; 8 (3): 230–234. PMID: 16930111
27. Farrokhi F, Smiley D., Umpierrez G.E. Glycemic control in non-diabetic critically ill patients. *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2011; 25 (5): 813–824. DOI: 10.1016/j.beem.2011.05.004. PMID: 21925080
28. Yamada T., Shojima N., Noma H., Yamauchi T., Kadowaki T. Glycemic control, mortality, and hypoglycemia in critically ill patients: a systematic review and network meta-analysis of randomized controlled trials. *Intensive Care Med.* 2017; 43: 1–15. DOI: 10.1007/s00134-016-4523-0.
29. Yatabe T., Inoue S., Sakaguchi M, Egi M. The optimal target for acute glycemic control in critically ill patients: a network meta-analysis. *Intensive Care Med.* 2017; 43: 16–28. DOI: 10.1007/s00134-016-4558-2.
30. Fu Y., Sun Y., Zhang J., Cheng Y. Intensive glucose control for critically ill patients: an updated meta-analysis. *Endocr. Connect.* 2018; 7 (12): 1288–1298. DOI: 10.1530/EC-18-0393. PMID: 30352416
31. Krinsley J. Association between hyperglycemia and increased hospital mortality in a heterogeneous population of critically ill patients. *Mayo Clin. Proc.* 2003. 78 (12): 1471–1478. DOI: 10.4065/78.12.1471. PMID: 14661676
32. Krinsley J.S., Grover A. Severe hypoglycemia in critically ill patients: risk factors and outcomes. *Crit. Care Med.* 2007; 35: 2262–2267. DOI: 10.1097/01.CCM.0000282073.98414.4B. PMID: 17717490
33. Clain J., Ramar K., Surani S.R. Glucose control in critical care. *World J Diabetes.* 2015; 6 (9): 1082–1091. DOI: 10.4239/wjd.v6.i9.1082. PMID: 26265994
34. Han H., Li Y., Fang J., Liu G., Yin J., Li T., Yin Y. Gut microbiota and type 1 diabetes. *Int. J. Mol. Sci.* 2018; 19 (4): 995. DOI: 10.3390/ijms19040995. PMID: 29584630
35. Zhao L., Zhang F., Ding X., Wu G., Lam Y.Y., Wang X., Fu H., Xue X., Lu C., Ma J., Yu L., Xu C., Ren Z., Xu Y., Xu S., Shen H., Zhu X., Shi Y., Shen Q., Dong W., Liu R., Ling Y., Zeng Y., Wang X., Zhang Q., Wang J., Wang L., Wu Y., Zeng B., Wei H., Zhang M., Peng Y., Zhang C. Gut bacteria selectively promoted by dietary fibers alleviate type 2 diabetes. *Science.* 2018; 359 (6380): 1151. DOI: 10.1126/science.aao5774. PMID: 29590046
36. Hirose T., Shimizu K., Ogura H., Tasaki O., Hamasaki T., Yamano S., Ohnishi M., Kuwagata Y., Shimazu T. Altered balance of the amino-gram in patients with sepsis – the relation to mortality. *Clin. Nutr.* 2014; 33 (1): 179–182. DOI: 10.1016/j.clnu.2013.11.017. PMID: 24377412
37. Carro M.L.F. Proteins, Catabolism and Sepsis: A Literature Review. *EC Nutrition.* 2018; 13.3: 126–134.
38. Nyangale E.P., Mottram D.S., Gibson G.R. Gut microbial activity, implications for health and disease: The potential role of metabolite analysis. *J. Proteome Res.* 2012; 11 (12): 5573. DOI: 10.1021/pr300637d. PMID: 23116228
39. Bröer S., Bröer A. Amino acid homeostasis and signalling in mammalian cells and organisms. *Biochem J.* 2017; 474 (12): 1935–1963. DOI: 10.1042/BCJ20160822. PMID: 28546457
40. Sitkin S.I., Vakhitov T.Y., Demyanova E.V. Microbiome, gut dysbiosis and inflammatory bowel disease: That moment when the function is more important than taxonomy. *Almanac of Clinical Medicine.* 2018; 46 (5): 396. DOI: 10.18786/2072-0505-2018-46-5-396-425.
41. Su L., Li H., Xie A., Liu D., Rao W., Lan L., Li X., Li F., Xiao K., Wang H., Yan P., Li X., Xie L. Dynamic changes in amino acid concentration profiles in patients with sepsis. *PLoS One.* 2015; 10 (4): e0121933. DOI: 10.1371/journal.pone.0121933. PMID: 25849571
42. Gunst J., Vanhorebeek L., Thiessen S.E., Van den Bergh G. Amino acid supplements in critically ill patients. *Pharmacol. Res.* 2018; 130: 127–131. DOI: 10.1016/j.phrs.2017.12.007. PMID: 29223645
43. Beloborodova N.V., Sarshor Yu.N., Bedova A.Yu., Chervenskaya E.A., Pautova A.K. Involvement of Aromatic Metabolites in the Pathogenesis of Septic Shock. *Shock.* 2018; 50 (3): 273–279. DOI: 10.1097/SHK.0000000000001064. PMID: 29189605
44. Федотчева Н.И., Литвинова Е.Г., Осипов А.А., Оленин А.Ю., Мороз В.В., Белобородова Н.В. The effect of microbial metabolites of phenolic nature on the activity of mitochondrial enzymes. *Бифизика.* 2015; 60 (6): 1118–1124 [In Russ.].
45. Mottauea W., Chiang C.-K., Mühlbauer M., Starr A.E., Butcher J., Abujamel T., Deeke S.A., Brandel A., Zhou H., Shokrala S., Hajibabaei M., Singleton R., Benchimol E.L., Jobin C., Mack D.R., Figeys D., Stintzi A. Altered intestinal microbiota–host mitochondria crosstalk in new onset Crohn's disease. *Nat. Commun.* 2016; 7: 13419. DOI: 10.1038/ncomms13419.
46. Franco-Oregon A., Gilbert J.A. The Microbiome-Mitochondrion connection: Common Ancestries, Common Mechanisms, Common Goals. *mSystems.* 2017; 2 (3): e00018-17. DOI: 10.1128/mSystems.00018-17. PMID: 28497122
47. Waldecker M., Kautenburger T., Daumann H., Busch C., Schrenk D. Inhibition of histone-deacetylase activity by short-chain fatty acids and some polyphenol metabolites formed in the colon. *J. Nutr. Biochem.* 2008; 19 (9): 587–593. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2007.08.002. PMID: 18061431
48. Kaelin W.G.Jr., McKnight S.L. Influence of metabolism on epigenetics and disease. *Cell.* 2013; 153 (1): 56–69. DOI: 10.1016/j.cell.2013.03.004. PMID: 23540690
49. Baeza J., Smallegan M.J., Denu J.M. Mechanisms and Dynamics of Protein Acetylation in Mitochondria. *Trends Biochem. Sci.* 2016; 41 (3): 231–244. DOI: 10.1016/j.tibs.2015.12.006. PMID: 26822488
50. Menzies K.J., Zhang H., Katsyuba E., Auwerx J. Protein acetylation in metabolism — metabolites and cofactors. *Nat Rev Endocrinol.* 2016; 12 (1): 43–60. DOI: 10.1038/nrendo.2015.181. PMID: 26503676

51. Henze K., Martin W. Evolutionary biology: essence of mitochondria. *Nature*. 2003; 426 (6963): 127–128. DOI: 10.1038/426127a.
52. McBride H.M., Neuspiel M., Wasiak S. Mitochondria: more than just a powerhouse. *Curr. Biol.* 2006; 16 (14): R551–560. DOI: 10.1016/j.cub.2006.06.054. PMID: 16860735
53. Sanchis-Gomar F., García-Giménez J.L., Gómez-Cabrera M.C., Pallardó F.V. Mitochondrial biogenesis in health and disease. Molecular and therapeutic approaches. *Curr. Pharm. Des.* 2014; 20 (35): 5619–5633. DOI: 10.2174/1381612820666140306095106. PMID: 24606801
54. Chandel N.S. Evolution of mitochondria as signaling organelles. *BMC Biol.* 2014; 12 (1): 34. DOI: 10.1186/1741-7007-12-34. PMID: 24884669
55. Вахитов Т.Я., Ситкин С.И. Концепция суперорганизма в биологии и медицине. *Эксперим. и клин. гастроэнтерология*. 2014; 7 (107): 72–85.
56. Klingensmith N.J., Coopersmith C.M. The gut as the motor of multiple organ dysfunction in critical illness. *Crit. Care Clin.* 2016; 32 (2): 203–212. DOI: 10.1016/j.ccc.2015.11.004. PMID: 27016162
57. Carrico C.J., Meakins J.L., Marshall J.C., Fry D., Maier R.V. Multiple-organ-failure syndrome. The gastrointestinal tract: the «motor» of MOF. *Arch Surg.* 1986; 121 (2): 196–208.
58. Mittal R., Coopersmith C.M. Redefining the gut as the motor of critical illness. *Trends Mol. Med.* 2014; 20 (4): 214–223. DOI: 10.1016/j.molmed.2013.08.004. PMID: 24055446
59. Clark J.A., Coopersmith C.M. Intestinal crosstalk: a new paradigm for understanding the gut as the «motor» of critical illness. *Shock*. 2007; 28 (4): 384–393. DOI: 10.1097/shk.0b013e31805569df. PMID: 17577136
60. Singer M., Deutschman C.S., Seymour C.W., Shankar-Hari M., Annane D., Bauer M., Bellomo R., Bernard G.R., Chiche J.D., Coopersmith C.M., Hotchkiss R.S., Levy M.M., Marshall J.C., Martin G.S., Opal S.M., Rubenfeld G.D., van der Poll T., Vincent J.L., Angus D.C. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016; 315 (8): 801–810. DOI: 10.1001/jama.2016.0287. PMID: 26903338
61. Singh V., Roth S., Llovera G., Sadler R., Garzetti D., Stecher B., Dichgans M., Liesz A. Microbiota dysbiosis controls the neuroinflammatory response after stroke. *J. Neurosci.* 2016; 36 (28): 7428. DOI: 10.1523/jneurosci.1114-16.2016. PMID: 27413153
62. Dovrolis N., Kolios G., Spyrou G.M., Maroulakou I. Computational profiling of the gut-brain axis: Microflora dysbiosis insights to neurological disorders. *Brief. Bioinform.* 2019; 20 (3): 825–841. DOI: 10.1093/bib/bbx154. PMID: 29186317
63. Averina O.V., Danilenko V.N. Human intestinal microbiota: Role in development and functioning of the nervous system. *Microbiology*. 2017; 86 (1): 1–18. DOI: 10.1134/S0026261717010040.
64. Yissachar N., Zhou Y., Ung L., Lai N.Y., Mohan J.F., Ehrlicher A., Weitz D.A., Kasper D.L., Chiu I.M., Mathis D., Benoist C. An Intestinal Organ Culture System Uncovers a Role for the Nervous System in Microbe-Immune Crosstalk. *Cell*. 2017; 168 (6): 1135–1148. DOI: 10.1016/j.cell.2017.02.009. PMID: 28262351
65. Kasatpibal N., Whitney J.D., Saokaew S., Kengkla K., Heitkemper M.M., Apisarnthanarak A. Effectiveness of Probiotic, Prebiotic, and Synbiotic Therapies in Reducing Postoperative Complications: A Systematic Review and Network Meta-analysis. *Clin. Infect. Dis.* 2017; 64 (Suppl. 2): S.153–1606. DOI: 10.1093/cid/cix114. PMID: 28475793
66. Villéger R., Lopès A., Carrier G., Veziat J., Billard E., Barnich N., Gagnière J., Vazeille E., Bonnet M. Intestinal Microbiota: A Novel Target to Improve Anti-Tumor Treatment? *Int. J. Mol. Sci.* 2019; 20 (18): E4584. DOI: 10.3390/ijms20184584. PMID: 31533218
67. Ruppé É., Lisboa T., Barbier F. The gut microbiota of critically ill patients: first steps in an unexplored world. *Int. Care Med.* 2018; 44 (9): 1561–1564. DOI: 10.1007/s00134-018-5309-3.
68. Белобородова Н. Интеграция метаболизма человека и его микробиома при критических состояниях. *Общая реаниматология*, 2012; 8 (4): 42–54. DOI: 10.15360/1813-9779-2102-4-42
69. Ilinskaya O.N., Ulyanova V.V., Yarullina D.R., Gataullin I.G. Secretome of intestinal bacilli: A natural guard against pathologies. *Front. Microbiol.* 2017; 8: 1666. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01666. PMID: 28919884
70. Wilson I.D., Nicholson J.K. Gut microbiome interactions with drug metabolism, efficacy, and toxicity. *Trans. Res.* 2017; 179: 204–222. DOI: 10.1016/j.trsl.2016.08.002. PMID: 27591027
71. Oleskin A.V., Shenderov B.A. Neuromodulatory effects and targets of the SCFAs and gasotransmitters produced by the human symbiotic microbiota. *Microb. Ecol. Health Dis.* 2016; 27: 30971. DOI: 10.3402/mehd.v27.30971.
72. Schroeder B.O., Bäckhed F. Signals from the gut microbiota to distant organs in physiology and disease. *Nat. Med.* 2016; 22 (10): 1079–1089. DOI: 10.1038/nm.4185. PMID: 27711063
73. Zhou C.B., Fang J.Y. The regulation of host cellular and gut microbial metabolism in the development and prevention of colorectal cancer. *Crit. Rev. Microbiol.* 2018; 44 (4): 436. DOI: 10.1080/1040841X.2018.1425671.
74. Omotayo O., Erejuwa, Siti A., Sulaiman, Mohd S. Ab Wahab Modulation of Gut Microbiota in the Management of Metabolic Disorders: The Prospects and Challenges *Int J Mol Sci.* 2014; 15 (3): 4158–4188. DOI: 10.3390/ijms15034158. PMID: 24608927
75. Beloborodova N.V., Chernevskaya E.A., Pautova A.K., Bedova A.Y., Sergeev A.A. Altered serum profile of aromatic metabolites reflects the biodiversity reduction of gut microbiota in critically ill patients. *Crit. Care*. 2018; 22 (Suppl 1): 82. DOI: 10.1186/s13054-018-1973-5.
51. Henze K., Martin W. Evolutionary biology: essence of mitochondria. *Nature*. 2003; 426 (6963): 127–128. DOI: 10.1038/426127a.
52. McBride H.M., Neuspiel M., Wasiak S. Mitochondria: more than just a powerhouse. *Curr. Biol.* 2006; 16 (14): R551–560. DOI: 10.1016/j.cub.2006.06.054. PMID: 16860735
53. Sanchis-Gomar F., García-Giménez J.L., Gómez-Cabrera M.C., Pallardó F.V. Mitochondrial biogenesis in health and disease. Molecular and therapeutic approaches. *Curr. Pharm. Des.* 2014; 20 (35): 5619–5633. DOI: 10.2174/1381612820666140306095106. PMID: 24606801
54. Chandel N.S. Evolution of mitochondria as signaling organelles. *BMC Biol.* 2014; 12 (1): 34. DOI: 10.1186/1741-7007-12-34. PMID: 24884669
55. Vakhitov T.Ya., Sitkin S.I. The concept of a superorganism in biology and medicine. *Ekspirim. i klin. gastroenterologiya*. 2014; 7 (107): 72–85 [In Russ.]
56. Klingensmith N.J., Coopersmith C.M. The gut as the motor of multiple organ dysfunction in critical illness. *Crit. Care Clin.* 2016; 32 (2): 203–212. DOI: 10.1016/j.ccc.2015.11.004. PMID: 27016162
57. Carrico C.J., Meakins J.L., Marshall J.C., Fry D., Maier R.V. Multiple-organ-failure syndrome. The gastrointestinal tract: the «motor» of MOF. *Arch Surg.* 1986; 121 (2): 196–208.
58. Mittal R., Coopersmith C.M. Redefining the gut as the motor of critical illness. *Trends Mol. Med.* 2014; 20 (4): 214–223. DOI: 10.1016/j.molmed.2013.08.004. PMID: 24055446
59. Clark J.A., Coopersmith C.M. Intestinal crosstalk: a new paradigm for understanding the gut as the «motor» of critical illness. *Shock*. 2007; 28 (4): 384–393. DOI: 10.1097/shk.0b013e31805569df. PMID: 17577136
60. Singer M., Deutschman C.S., Seymour C.W., Shankar-Hari M., Annane D., Bauer M., Bellomo R., Bernard G.R., Chiche J.D., Coopersmith C.M., Hotchkiss R.S., Levy M.M., Marshall J.C., Martin G.S., Opal S.M., Rubenfeld G.D., van der Poll T., Vincent J.L., Angus D.C. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016; 315 (8): 801–810. DOI: 10.1001/jama.2016.0287. PMID: 26903338
61. Singh V., Roth S., Llovera G., Sadler R., Garzetti D., Stecher B., Dichgans M., Liesz A. Microbiota dysbiosis controls the neuroinflammatory response after stroke. *J. Neurosci.* 2016; 36 (28): 7428. DOI: 10.1523/jneurosci.1114-16.2016. PMID: 27413153
62. Dovrolis N., Kolios G., Spyrou G.M., Maroulakou I. Computational profiling of the gut-brain axis: Microflora dysbiosis insights to neurological disorders. *Brief. Bioinform.* 2019; 20 (3): 825–841. DOI: 10.1093/bib/bbx154. PMID: 29186317
63. Averina O.V., Danilenko V.N. Human intestinal microbiota: Role in development and functioning of the nervous system. *Microbiology*. 2017; 86 (1): 1–18. DOI: 10.1134/S0026261717010040.
64. Yissachar N., Zhou Y., Ung L., Lai N.Y., Mohan J.F., Ehrlicher A., Weitz D.A., Kasper D.L., Chiu I.M., Mathis D., Benoist C. An Intestinal Organ Culture System Uncovers a Role for the Nervous System in Microbe-Immune Crosstalk. *Cell*. 2017; 168 (6): 1135–1148. DOI: 10.1016/j.cell.2017.02.009. PMID: 28262351
65. Kasatpibal N., Whitney J.D., Saokaew S., Kengkla K., Heitkemper M.M., Apisarnthanarak A. Effectiveness of Probiotic, Prebiotic, and Synbiotic Therapies in Reducing Postoperative Complications: A Systematic Review and Network Meta-analysis. *Clin. Infect. Dis.* 2017; 64 (Suppl. 2): S.153–1606. DOI: 10.1093/cid/cix114. PMID: 28475793
66. Villéger R., Lopès A., Carrier G., Veziat J., Billard E., Barnich N., Gagnière J., Vazeille E., Bonnet M. Intestinal Microbiota: A Novel Target to Improve Anti-Tumor Treatment? *Int. J. Mol. Sci.* 2019; 20 (18): E4584. DOI: 10.3390/ijms20184584. PMID: 31533218
67. Ruppé É., Lisboa T., Barbier F. The gut microbiota of critically ill patients: first steps in an unexplored world. *Int. Care Med.* 2018; 44 (9): 1561–1564. DOI: 10.1007/s00134-018-5309-3.
68. Beloborodova N.V. Integration of Metabolism in Man and His Microbiome in Critical Conditions. *Obshchaya Reanimatologiya—General Reanimatology*. 2012; 8 (4): 42. (In Russ.) DOI: 10.15360/1813-9779-2012-4-42
69. Ilinskaya O.N., Ulyanova V.V., Yarullina D.R., Gataullin I.G. Secretome of intestinal bacilli: A natural guard against pathologies. *Front. Microbiol.* 2017; 8: 1666. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01666. PMID: 28919884
70. Wilson I.D., Nicholson J.K. Gut microbiome interactions with drug metabolism, efficacy, and toxicity. *Trans. Res.* 2017; 179: 204–222. DOI: 10.1016/j.trsl.2016.08.002. PMID: 27591027
71. Oleskin A.V., Shenderov B.A. Neuromodulatory effects and targets of the SCFAs and gasotransmitters produced by the human symbiotic microbiota. *Microb. Ecol. Health Dis.* 2016; 27: 30971. DOI: 10.3402/mehd.v27.30971.
72. Schroeder B.O., Bäckhed F. Signals from the gut microbiota to distant organs in physiology and disease. *Nat. Med.* 2016; 22 (10): 1079–1089. DOI: 10.1038/nm.4185. PMID: 27711063
73. Zhou C.B., Fang J.Y. The regulation of host cellular and gut microbial metabolism in the development and prevention of colorectal cancer. *Crit. Rev. Microbiol.* 2018; 44 (4): 436. DOI: 10.1080/1040841X.2018.1425671.
74. Omotayo O., Erejuwa, Siti A., Sulaiman, Mohd S. Ab Wahab Modulation of Gut Microbiota in the Management of Metabolic Disorders: The Prospects and Challenges *Int J Mol Sci.* 2014; 15 (3): 4158–4188. DOI: 10.3390/ijms15034158. PMID: 24608927
75. Beloborodova N.V., Chernevskaya E.A., Pautova A.K., Bedova A.Y., Sergeev A.A. Altered serum profile of aromatic metabolites reflects the biodiversity reduction of gut microbiota in critically ill patients. *Crit. Care*. 2018; 22 (Suppl 1): 82. DOI: 10.1186/s13054-018-1973-5.

Reviews

76. Bhalodi A.A., van Engelen T.S.R., Virk H.S., Wiersinga W.J. Impact of antimicrobial therapy on the gut microbiome. *J. Antimicrob. Chemother.* 2019; 74 (Supplement_1): i6–i15. DOI: 10.1093/jac/dky530. PMID: 30690540
77. Lamarche D., Johnstone J., Zytaruk N., Clarke F., Hand L., Loukov D., Szamosi J.C., Rossi L., Schenck L.P., Verschoor C.P., McDonald E., Meade M.O., Marshall J.C., Bowdish D.M.E., Karachi T., Heels-Ansell D., Cook D.J., Surette M.G.; PROSPECT Investigators; Canadian Critical Care Trials Group; Canadian Critical Care Translational Biology Group. Microbial dysbiosis and mortality during mechanical ventilation: a prospective observational study. *Respir Res.* 2018; 19 (1): 245. DOI: 10.1186/s12931-018-0950-5. PMID: 30526610
78. Xu R., Tan C., Zhu J., Zeng X., Gao X., Wu Q., Chen Q., Wang H., Zhou H., He Y., Pan S., Yin J. Dysbiosis of the intestinal microbiota in neurocritically ill patients and the risk for death. *Crit. Care.* 2019; 23 (1): 195. DOI: 10.1186/s13054-019-2488-4.
79. Yin L., Wan Y.D., Pan X.T., Zhou C.Y., Lin N., Ma C.T., Yao J., Su Z., Wan C., Yu Y.W., Zhu R.X. Association Between Gut Bacterial Diversity and Mortality in Septic Shock Patients: A Cohort Study. *Med. Sci. Monit.* 2019; 25: 7376–7382. DOI: 10.12659/MSM.916808.
80. Davison J.M., Wischmeyer P.E. Probiotic and symbiotic therapy in the critically ill: State of the art. *Nutrition.* 2019; 59: 29–36. DOI: 10.1016/j.nut.2018.07.017. PMID: 30415160
81. Beloborodova N., Moroz V., Osipov A., Bedova A., Sarshor Y., Vlasenko A., Olenin A. Tyrosine metabolism disorder and the potential capability of anaerobic microbiota to decrease the value of aromatic metabolites in critically ill patients. *Crit. Care.* 2014; 18 (Suppl 2): P60. DOI: 10.1186/cc14063 <http://ccforum.com/content/18/S2/P60>
82. Мороз В.В., Белобородова Н.В., Осипов А.А., Власенко А.В., Бедова А.Ю., Паутова А.К. Фенилкарбоновые кислоты в оценке тяжести состояния и эффективности интенсивного лечения больных в реаниматологии. *Общая реаниматология.* 2016; 12 (4): 37–48. DOI: 10.15360/1813-9779-2016-4-37-48
83. Besselink M.G., van Santvoort H.C., Buskens E., Boermeester M.A., van Goor H., Timmerman H.M., Nieuwenhuijs V.B., Bollen T.L., van Ramshorst B., Witteman B.J., Rosman C., Ploeg R.J., Brink M.A., Schaapherder A.F., Dejong C.H., Wahab P.J., van Laarhoven C.J., van der Harst E., van Eijck C.H., Cuesta M.A., Akkermans L.M., Gooszen H.G.; Dutch Acute Pancreatitis Study Group. Probiotic prophylaxis in predicted severe acute pancreatitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet.* 2008; 371 (9613): 651–659. DOI: 10.1016/S0140-6736 (08)60207-X. PMID: 18279948
84. Morrow L.E., Wischmeyer P. Blurred Lines: Dysbiosis and Probiotics in the ICU. *Chest.* 2017; 151 (2): 492–499. DOI: 10.1016/j.chest.2016.10.006. PMID: 27771302
85. Manzanares W., Lemieux M., Langlois P.L., Wischmeyer P.E. Probiotic and synbiotic therapy in critical illness: A systematic review and meta-analysis. *Crit. Care.* 2016; 19: 262. DOI: 10.1186/s13054-016-1434-y. PMID: 27538711
86. Bongaerts G.P., Severijnen R.S. A reassessment of the PROPATRIA study and its implications for probiotic therapy. *Nat. Biotechnol.* 2016; 34 (1): 55–63. DOI: 10.1038/nbt.3436.
87. Mukherjee S., Joardar N., Sengupta S., Babu S.P.S. Gut microbes as future therapeutics in treating inflammatory and infectious diseases: Lessons from recent findings. *J. Nutr. Biochem.* 2018; 61: 111. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2018.07.010. PMID: 30196243
88. Шендеров Б.А., Каченко Е.И., Лазебник Л.Б., Ардатская М.Д., Синица А.В., Захарченко М.М. Метабиотики — новая технология профилактики и лечения заболеваний, связанных с микробиологическими нарушениями в организме человека. *Экспер. и клин. гастроэнтерология.* 2018; 151 (3): 83–92.
89. Espin J.C., Gonzalez-Sarrias A., Tomas-Barberan F.A. The gut microbiota: A key factor in the therapeutic effects of (poly) phenols. *Biochem. Pharmacol.* 2017; 139: 82–93. DOI: 10.1016/j.bcp.2017.04.033. PMID: 28483461
90. Spreadborough P., Lort S., Pasquali S., Popplewell M., Owen A., Kreis I., Tucker O., Vohra R.S. and on behalf of the Preventing Postoperative Pneumonia Study Group and the West Midlands Research Collaborative. A systematic review and meta-analysis of perioperative oral decontamination in patients undergoing major elective surgery. *Perioper. Med.* 2016; 5: 6. DOI: 10.1186/s13741-016-0030-7.
91. Resino E., San-Juan R., Aguado J.M. Selective intestinal decontamination for the prevention of early bacterial infections after liver transplantation. *World J. Gastroenterol.* 2016; 22 (26): 5950–5957. DOI: 10.3748/wjg.v22.i26.5950. PMID: 27468189
92. Zandstra D.F., Van Saene H.K. Selective decontamination of the digestive tract as infection prevention in the critically ill. A level 1 evidence-based strategy. *Minerva Anesthesiol.* 2011; 77 (2): 212–219. PMID: 21102395
93. Sánchez-Ramírez C., Hipola-Escalada S., Cabrera-Santana M., Hernández-Viera M.A., Caipe-Balcázar L., Saavedra P., Artilles-Campelo F., Sangil-Monroy N., Lübke-Vázquez C.F., Ruiz-Santana S. Long-term use of selective digestive decontamination in an ICU highly endemic for bacterial resistance. *Critical Care.* 2018; 22: 141 DOI: 10.1186/s13054-018-2057-2
94. Price R., MacLennan G., Glen J., SuDDICU Collaboration. Selective digestive or oropharyngeal decontamination and topical oropharyngeal chlorhexidine for prevention of death in general intensive care:
76. Bhalodi A.A., van Engelen T.S.R., Virk H.S., Wiersinga W.J. Impact of antimicrobial therapy on the gut microbiome. *J. Antimicrob. Chemother.* 2019; 74 (Supplement_1): i6–i15. DOI: 10.1093/jac/dky530. PMID: 30690540
77. Lamarche D., Johnstone J., Zytaruk N., Clarke F., Hand L., Loukov D., Szamosi J.C., Rossi L., Schenck L.P., Verschoor C.P., McDonald E.B., Meade M.O., Marshall J.C., Bowdish D.M.E., Karachi T., Heels-Ansell D., Cook D.J., Surette M.G.; PROSPECT Investigators; Canadian Critical Care Trials Group; Canadian Critical Care Translational Biology Group. Microbial dysbiosis and mortality during mechanical ventilation: a prospective observational study. *Respir Res.* 2018; 19 (1): 245. DOI: 10.1186/s12931-018-0950-5. PMID: 30526610
78. Xu R., Tan C., Zhu J., Zeng X., Gao X., Wu Q., Chen Q., Wang H., Zhou H., He Y., Pan S., Yin J. Dysbiosis of the intestinal microbiota in neurocritically ill patients and the risk for death. *Crit. Care.* 2019; 23 (1): 195. DOI: 10.1186/s13054-019-2488-4.
79. Yin L., Wan Y.D., Pan X.T., Zhou C.Y., Lin N., Ma C.T., Yao J., Su Z., Wan C., Yu Y.W., Zhu R.X. Association Between Gut Bacterial Diversity and Mortality in Septic Shock Patients: A Cohort Study. *Med. Sci. Monit.* 2019; 25: 7376–7382. DOI: 10.12659/MSM.916808.
80. Davison J.M., Wischmeyer P.E. Probiotic and symbiotic therapy in the critically ill: State of the art. *Nutrition.* 2019; 59: 29–36. DOI: 10.1016/j.nut.2018.07.017. PMID: 30415160
81. Beloborodova N., Moroz V., Osipov A., Bedova A., Sarshor Y., Vlasenko A., Olenin A. Tyrosine metabolism disorder and the potential capability of anaerobic microbiota to decrease the value of aromatic metabolites in critically ill patients. *Crit. Care.* 2014; 18 (Suppl 2): P60. DOI: 10.1186/cc14063 <http://ccforum.com/content/18/S2/P60>
82. Мороз В.В., Белобородова Н.В., Осипов А.А., Власенко А.В., Бедова А.Ю., Паутова А.К. Фенилкарбоновые кислоты в оценке тяжести состояния и эффективности интенсивного лечения больных в реаниматологии. *Общая реаниматология.* 2016; 12 (4): 37–48. DOI: 10.15360/1813-9779-2016-4-37-48
83. Besselink M.G., van Santvoort H.C., Buskens E., Boermeester M.A., van Goor H., Timmerman H.M., Nieuwenhuijs V.B., Bollen T.L., van Ramshorst B., Witteman B.J., Rosman C., Ploeg R.J., Brink M.A., Schaapherder A.F., Dejong C.H., Wahab P.J., van Laarhoven C.J., van der Harst E., van Eijck C.H., Cuesta M.A., Akkermans L.M., Gooszen H.G.; Dutch Acute Pancreatitis Study Group. Probiotic prophylaxis in predicted severe acute pancreatitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet.* 2008; 371 (9613): 651–659. DOI: 10.1016/S0140-6736 (08)60207-X. PMID: 18279948
84. Morrow L.E., Wischmeyer P. Blurred Lines: Dysbiosis and Probiotics in the ICU. *Chest.* 2017; 151 (2): 492–499. DOI: 10.1016/j.chest.2016.10.006. PMID: 27771302
85. Manzanares W., Lemieux M., Langlois P.L., Wischmeyer P.E. Probiotic and synbiotic therapy in critical illness: A systematic review and meta-analysis. *Crit. Care.* 2016; 19: 262. DOI: 10.1186/s13054-016-1434-y. PMID: 27538711
86. Bongaerts G.P., Severijnen R.S. A reassessment of the PROPATRIA study and its implications for probiotic therapy. *Nat. Biotechnol.* 2016; 34 (1): 55–63. DOI: 10.1038/nbt.3436.
87. Mukherjee S., Joardar N., Sengupta S., Babu S.P.S. Gut microbes as future therapeutics in treating inflammatory and infectious diseases: Lessons from recent findings. *J. Nutr. Biochem.* 2018; 61: 111. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2018.07.010. PMID: 30196243
88. Shenderov B.A., Tkachenko E.I., Lazebnik L.B., Ardatkaya M.D., Sinitsa A.V., Zakharchenko M.M. Metabiotics - a new technology for the prevention and treatment of diseases associated with microecological disorders in the human body. *Eksper. i klin. gastroenterologiya.* 2018; 151 (3): 83–92 [In Russ.]
89. Espin J.C., Gonzalez-Sarrias A., Tomas-Barberan F.A. The gut microbiota: A key factor in the therapeutic effects of (poly) phenols. *Biochem. Pharmacol.* 2017; 139: 82–93. DOI: 10.1016/j.bcp.2017.04.033. PMID: 28483461
90. Spreadborough P., Lort S., Pasquali S., Popplewell M., Owen A., Kreis I., Tucker O., Vohra R.S. and on behalf of the Preventing Postoperative Pneumonia Study Group and the West Midlands Research Collaborative. A systematic review and meta-analysis of perioperative oral decontamination in patients undergoing major elective surgery. *Perioper. Med.* 2016; 5: 6. DOI: 10.1186/s13741-016-0030-7.
91. Resino E., San-Juan R., Aguado J.M. Selective intestinal decontamination for the prevention of early bacterial infections after liver transplantation. *World J. Gastroenterol.* 2016; 22 (26): 5950–5957. DOI: 10.3748/wjg.v22.i26.5950. PMID: 27468189
92. Zandstra D.F., Van Saene H.K. Selective decontamination of the digestive tract as infection prevention in the critically ill. A level 1 evidence-based strategy. *Minerva Anesthesiol.* 2011; 77 (2): 212–219. PMID: 21102395
93. Sánchez-Ramírez C., Hipola-Escalada S., Cabrera-Santana M., Hernández-Viera M.A., Caipe-Balcázar L., Saavedra P., Artilles-Campelo F., Sangil-Monroy N., Lübke-Vázquez C.F., Ruiz-Santana S. Long-term use of selective digestive decontamination in an ICU highly endemic for bacterial resistance. *Critical Care.* 2018; 22: 141 DOI: 10.1186/s13054-018-2057-2
94. Price R., MacLennan G., Glen J., SuDDICU Collaboration. Selective digestive or oropharyngeal decontamination and topical oropharyngeal chlorhexidine for prevention of death in general intensive care:

- systematic review and network meta-analysis. *BMJ*. 2014; 348: g2197. DOI: 10.1136/bmj.g2197. PMID: 24687313
95. Buelow E., Bello González T.D.J., Fuentes S., de Steenhuijsen Piter W.A.A., Lahti L., Bayjanov J.R., Majoor E.A.M., Braat J.C., van Mourik M.S.M., Oostdijk E.A.N., Willems R.J.L., Bonten M.J.M., van Passel M.W.J., Smidt H., van Schaik W. Comparative gut microbiota and resistance profiling of intensive care patients receiving selective digestive tract decontamination and healthy subjects. *Microbiome*. 2017; 5 (1): 88. DOI: 10.1186/s40168-017-0309-z. PMID: 28803549
 96. van Nood E., Speelman P., Nieuwdorp M., Keller J. Fecal microbiota transplantation: Facts and controversies. *Curr. Opin. Gastroenterol*. 2014; 30 (1): 34–39. DOI: 10.1097/MOG.000000000000024. PMID: 24241245
 97. Han S., Shannahan S., Pellish R. Fecal microbiota transplant: Treatment options for *Clostridium difficile* infection in the intensive care unit. *J. Intensive Care Med*. 2015; 31 (9): 577–586. DOI: 10.1177/0885066615594344. PMID: 26141116
 98. McClave S.A., Patel J., Bhutiani N. Should fecal microbial transplantation be used in the ICU? *Curr. Opin. Crit. Care*. 2018; 24 (2): 105–111. DOI: 10.1097/MCC.0000000000000489. PMID: 29432297
 99. FDA In Brief: Important Safety Alert Regarding Use of Fecal Microbiota for Transplantation and Risk of Serious Adverse Reactions Due to Transmission of Multi-Drug Resistant Organisms. 13 June 2019. Available from: <https://www.fda.gov/news-events/fda-brief/fda-brief-fda-warns-about-potential-risk-serious-infections-caused-multi-drug-resistant-organisms>
 100. Beloborodova N., Sarshor Y. The first experience of targeted antibiotics for the regulation of the metabolic activity of the gut microbiota (MAGM) in critically ill patients with pneumonia or abdominal infection. *Intensive Care Med. Experimental*. 2018; 6 (Suppl 2): 0399. DOI: 10.1186/s40635-018-0201-6.
 101. Белобородова Н.В., Мороз В.В., Бедова А.Ю. О роли ароматических микробных метаболитов. *Пат. физиология и экспериментальная терапия*. 2018; 62 (1): 97–108. DOI: 10.25557/0031-2991.2018.01.97-108.
 102. Beloborodova N.V., Olenin A.Yu., Pautova A.K. Metabolomic findings in sepsis as a damage of host-microbial metabolism integration. *J. Crit. Care*. 2018; 43: 246. DOI: 10.1016/j.jcrc.2017.09.014. PMID: 28942199
 103. Chervenskaya E., Beloborodova N. Microbiota-Oriented Diagnostics and Therapy in Sepsis: Utopia or Necessity? [Open access peer-reviewed chapter — Online First]. In: *Sepsis*. London, United Kingdom: IntechOpen; 2019. DOI: 10.5772/intechopen.89187.
 104. Beloborodova N.V., Grechko A.V., Olenin A.Yu. Metabolomic Discovery of Microbiota Dysfunction as the Cause of Pathology. [Online First]. In: *Metabolomics — New Insights into Biology and Medicine*. London, United Kingdom: IntechOpen; 2019: 21. ISBN: 978-1-78985-127-4. DOI: 10.5772/intechopen.87176
 - systematic review and network meta-analysis. *BMJ*. 2014; 348: g2197. DOI: 10.1136/bmj.g2197. PMID: 24687313
 95. Buelow E., Bello González T.D.J., Fuentes S., de Steenhuijsen Piter W.A.A., Lahti L., Bayjanov J.R., Majoor E.A.M., Braat J.C., van Mourik M.S.M., Oostdijk E.A.N., Willems R.J.L., Bonten M.J.M., van Passel M.W.J., Smidt H., van Schaik W. Comparative gut microbiota and resistance profiling of intensive care patients receiving selective digestive tract decontamination and healthy subjects. *Microbiome*. 2017; 5 (1): 88. DOI: 10.1186/s40168-017-0309-z. PMID: 28803549
 96. van Nood E., Speelman P., Nieuwdorp M., Keller J. Fecal microbiota transplantation: Facts and controversies. *Curr. Opin. Gastroenterol*. 2014; 30 (1): 34–39. DOI: 10.1097/MOG.000000000000024. PMID: 24241245
 97. Han S., Shannahan S., Pellish R. Fecal microbiota transplant: Treatment options for *Clostridium difficile* infection in the intensive care unit. *J. Intensive Care Med*. 2015; 31 (9): 577–586. DOI: 10.1177/0885066615594344. PMID: 26141116
 98. McClave S.A., Patel J., Bhutiani N. Should fecal microbial transplantation be used in the ICU? *Curr. Opin. Crit. Care*. 2018; 24 (2): 105–111. DOI: 10.1097/MCC.0000000000000489. PMID: 29432297
 99. FDA In Brief: Important Safety Alert Regarding Use of Fecal Microbiota for Transplantation and Risk of Serious Adverse Reactions Due to Transmission of Multi-Drug Resistant Organisms. 13 June 2019. Available from: <https://www.fda.gov/news-events/fda-brief/fda-brief-fda-warns-about-potential-risk-serious-infections-caused-multi-drug-resistant-organisms>
 100. Beloborodova N., Sarshor Y. The first experience of targeted antibiotics for the regulation of the metabolic activity of the gut microbiota (MAGM) in critically ill patients with pneumonia or abdominal infection. *Intensive Care Med. Experimental*. 2018; 6 (Suppl 2): 0399. DOI: 10.1186/s40635-018-0201-6.
 101. Beloborodova N.V., Moroz V.V., Bedova A.Yu. On the role of aromatic microbial metabolites. *Pat. fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya*. 2018; 62 (1): 97–108 [In Russ.]. DOI: 10.25557/0031-2991.2018.01.97-108.
 102. Beloborodova N.V., Olenin A.Yu., Pautova A.K. Metabolomic findings in sepsis as a damage of host-microbial metabolism integration. *J. Crit. Care*. 2018; 43: 246. DOI: 10.1016/j.jcrc.2017.09.014. PMID: 28942199
 103. Chervenskaya E., Beloborodova N. Microbiota-Oriented Diagnostics and Therapy in Sepsis: Utopia or Necessity? [Open access peer-reviewed chapter — Online First]. In: *Sepsis*. London, United Kingdom: IntechOpen; 2019. DOI: 10.5772/intechopen.89187.
 104. Beloborodova N.V., Grechko A.V., Olenin A.Yu. Metabolomic Discovery of Microbiota Dysfunction as the Cause of Pathology. [Online First]. In: *Metabolomics — New Insights into Biology and Medicine*. London, United Kingdom: IntechOpen; 2019: 21. ISBN: 978-1-78985-127-4. DOI: 10.5772/intechopen.87176

Поступила 28.06.19

Received 28.06.19

Заболевания печени и гемостаз (обзор)

Часть II. Холестатические заболевания печени и гемостаз

В. И. Решетняк¹, И. В. Маев¹, Т. М. Решетняк², С. В. Журавель³, В. М. Писарев⁴

¹ Московский государственный медико-стоматологический университет им. А. И. Евдокимова Минздрава России, Россия, 127473, г. Москва, ул. Делегатская, д. 20, стр. 1

² НИИ ревматологии им. В. А. Насоновой, Россия, 115522, г. Москва, Каширское шоссе, д. 34А

³ НИИ скорой помощи им. Н. В. Склифосовского ДЗМ, Россия, 129090, г. Москва, Большая Сухаревская пл., д. 3

⁴ НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского ФНКЦ РР, Россия, 107031, г. Москва, ул. Петровка, д. 25, стр. 2

Liver Disease and Hemostasis (Review)

Part 2. Cholestatic Liver Disease and Hemostasis

Vasiliy I. Reshetnyak¹, Igor V. Maev¹, Tatiana M. Reshetnyak²,
Sergei V. Zhuravel³, Vladimir M. Pisarev⁴

¹ A. I. Evdokimov Moscow State University of medicine and dentistry, Ministry of Health of Russia, 20 Delegatskaya Str., Build 1, 127473 Moscow, Russia

² V. A. Nasonova Research Institute of Rheumatology, 34A Kashirskoye highway, Moscow 115522, Russia

³ N. V. Sklifosovsky Research Institute of Emergency Care, Moscow Healthcare Department, 3 Bolshaya Sukharevskaya Square, Moscow 129090, Russia

⁴ V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology, Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitology, 25 Petrovka Str., Build. 2, 107031 Moscow, Russia

Наличие или развитие нарушений функций печени может существенно осложнять течение критических и терминальных состояний. Системные нарушения гемостаза нередко являются ведущими у пациентов реаниматологического профиля с холестатическими заболеваниями печени, поэтому изучение механизмов их развития может внести вклад в понимание развития полиорганной недостаточности при критических состояниях.

В обзоре представлены современные данные об изменениях показателей гемостаза у пациентов с холестатическими заболеваниями печени, предлагается механизм развития таких нарушений, в котором участвуют фосфолипиды мембран тромбоцитов и эндотелиоцитов. Обосновывается предположение о том, что склонность к тромбозам у пациентов с холестатическими заболеваниями печени обусловлена повышенным накоплением желчных кислот в системном кровотоке. Приведены данные о том, что при антифосфолипидном синдроме предрасположенность к образованию тромбов обусловлена изменениями фосфолипидного состава мембран тромбоцитов и эндотелиальных клеток сосудов, возникающими в результате их взаимодействия с циркулирующими антифосфолипидными антителами. Обосновано положение о том, что познание механизмов, лежащих в основе развития изменений в системе свертывания крови при нарушениях функций печени, поможет поиску новых путей обеспечения оптимальной коррекции нарушений гемостаза у пациентов с хроническими заболеваниями печени.

Ключевые слова: гемостаз; нарушения коагуляции; холестатические заболевания печени

The presence or development of liver disorders can significantly complicate the course of critical illness and terminal conditions. Systemic hemostatic disorders are common in Intensive Care Units patients with cholestatic liver diseases, so the study of the mechanisms of their development can contribute to the understanding of the development of multiorgan failure in critical illness.

The review discusses current data on changes in hemostatic parameters in patients with cholestatic liver diseases, proposes a mechanism for the development of such disorders, which involve interactions of phospholipids with platelet and endotheliocyte membranes. It is suggested that a trend for thrombosis in patients with cholestatic liver disease is due to increased accumulation of bile acids in the systemic circulation. Available data demonstrate that the antiphospholipid syndrome may predispose to the formation of blood clots due to alterations of phospholipid composition of membranes of platelets and vascular endothelial cells by circulating

Адресс для корреспонденции:

Василий Иванович Решетняк
E-mail: vasilii.reshetnyak@yandex.ru

Correspondence to:

Vasiliy I. Reshetnyak
E-mail: vasilii.reshetnyak@yandex.ru

antiphospholipid antibodies. Clarifying the mechanisms contributing to changes of the blood coagulation system parameters in liver disorders will aid to development of optimal correction of hemostatic disorders in patients with chronic liver diseases.

Keywords: hemostasis; disorders of coagulation; cholestatic liver diseases

DOI:10.15360/1813-9779-2019-6-80-93

Введение

Система гемостаза представляет собой совокупность механизмов, обеспечивающих сохранение жидкого состояния крови, предупреждение и остановку кровотечений, а также целостности кровеносных сосудов. В ее функционировании принимают участие факторы свертывающей, противосвертывающей (антикоагулянтной) и фибринолитической систем крови. Изменение функционального состояния одного из звеньев в системе гемостаза пациентов с хроническими диффузными заболеваниями печени сопровождается компенсаторными сдвигами в деятельности других компонентов. Нарушение функциональных взаимосвязей при прогрессировании заболевания печени может привести как к увеличению риска кровотечения, так и развития тромбоза [1–5]. В предыдущей части обзора обсуждалось развитие склонности к кровотечениям у пациентов с нехолестатическими заболеваниями печени в ходе течения заболевания [2], в то время как при холестатических заболеваниях печени в процессе прогрессирования болезни отмечалась склонность к тромбообразованию [5–7]. Во второй части обзора обсуждаются вопросы нарушений в системе гемостаза у пациентов с холестатическими заболеваниями печени и с повреждениями печени сосудистого генеза, которые, как правило, сопровождаются гиперкоагуляцией. Предложен новый механизм развития нарушений в системе гемостаза при холестатических заболеваниях печени.

Холестатические повреждения печени и гемостаз. К хроническим холестатическим повреждениям печени относятся первичный билиарный холангит (ПБХ), ранее известный как первичный билиарный цирроз (ПБЦ) [9], и первичный склерозирующий холангит (ПСХ). ПБХ является хроническим холестатическим, гранулематозным и воспалительно-деструктивным поражением междольковых и септальных желчных протоков, которое может быть вызвано аутоиммунным механизмом с потенциальной тенденцией прогрессировать в цирроз [10–13]. ПБХ характеризуется опосредованной цитотоксическими Т клетками деструкцией эпителиоцитов, выстилающих мелкие внутрипеченочные желчные протоки. Это приводит к дуктулопении и стойкому внутрипеченочному холестазу, кото-

Introduction

The hemostasis represents a set of mechanisms that ensure the preservation of the liquid status of the blood, the prevention and stopping of bleeding, as well as the integrity of blood vessels. Coagulation factors, anticoagulant (anti-blood clotting) and fibrinolytic systems of blood are the functioning components of the hemostasis. Alterations of one components of hemostasis in patients with chronic liver diseases are accompanied by compensatory shifts in the activity of other components. Altered relationships within the hemostasis during the progression of liver disease increase the risk of bleeding or thrombosis [1–5]. In the previous part of the review, the development of the tendency to bleeding in patients with non-cholestatic liver diseases during the course of the disease was discussed [2], while in cholestatic liver diseases, the tendency to thrombosis was noted during the progression of the disease [5–7]. The second part of the review discusses the issues of hemostasis alterations in patients with cholestatic liver diseases and liver lesions due to vascular damages, which are commonly accompanied by hypercoagulation. A new mechanism for the development of disorders in the hemostatic system in cholestatic liver diseases is proposed.

Cholestatic liver damage and hemostasis.

Chronic cholestatic liver damage includes primary biliary cholangitis (PBC), formerly known as primary biliary cirrhosis [9], and primary sclerosing cholangitis (PSC). PBC is a chronic cholestatic, granulomatous and inflammatory-destructive lesion of the interlobular and septal bile ducts, which can be caused by an autoimmune mechanism with a potential tendency to progress into cirrhosis [10–13]. PBC is characterized by cytotoxic T cell-mediated destruction of epithelial cells lining the small intrahepatic bile ducts. This leads to ductulopenia and persistent intrahepatic cholestasis, which in the terminal stage causes the development of cirrhosis and liver failure.

PSC is a fairly rare chronic cholestatic liver disease characterized by inflammation, obliteration and fibrosis of the intra- and extrahepatic bile ducts, the development of biliary cirrhosis, portal hypertension and liver insufficiency [14]. In both PBC and PSC, the main pathological changes in the liver occur in the intrahepatic bile ducts. This leads to altered bile evacuation processes, accompanied by intrahepatic cholestasis. The latter in the early

рый в терминальной стадии обуславливает развитие цирроза и печеночной недостаточности.

ПСХ — довольно редкое хроническое холестатическое заболевание печени, характеризующееся воспалением, облитерацией и фиброзом внутри- и внепеченочных желчных протоков, развитием билиарного цирроза, портальной гипертензии и печеночной недостаточности [14]. Как при ПБХ, так и при ПСХ основные патологические изменения в печени происходят во внутрипеченочных желчных протоках. Это приводит к нарушению желчевыделения, сопровождающегося внутрипеченочным холестазом. Последний на ранних стадиях заболевания мало влияет на белково-синтетическую функцию печеночных клеток. Система гемостаза при этом довольно устойчива к развивающемуся внутрипеченочному холестазу. Прокоагуляционные, антикоагуляционные и фибринолитические показатели на ранних стадиях заболевания зачастую остаются в пределах нормальных значений [15, 16].

Пациенты с холестатическими заболеваниями печени характеризуются нормальными или повышенными показателями коагуляции: более высокий уровень ингибитора активации плазминогена 1 (ИАП-1) по сравнению с заболеваниями печени другой этиологии уравнивает повышенную активность тканевого активатора плазминогена (ТАП). И лишь на поздних стадиях заболевания за счет длительного токсического воздействия избыточных желчных кислот на структуру гепатоцита, происходит нарушение его функции, в том числе и белково-синтетической. Поэтому при холестатических заболеваниях печени изменения в свертывающей системе крови менее выражены, чем при циррозах печени вирусной и алкогольной природы. Лишь на очень поздних стадиях заболевания развивается печеночно-клеточная недостаточность и портальная гипертензия. Выживаемость при кровотечениях из варикозно расширенных вен пищевода и желудка при портальной гипертензии этих пациентов выше, чем при нехолестатических циррозах печени [17, 18].

В коагулограмме наблюдается удлинение тромбинового времени (ТВ) при нормальных значениях активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ) и протромбинового времени (ПВ); содержание фибриногена остается в пределах нормы или повышается. В связи с недостаточным количеством желчных кислот, поступающих в кишечник при ПСХ и ПБХ, отмечается уменьшение абсорбции из тонкого кишечника жирорастворимых витаминов, в том числе витамина К. Витамин К является обязательным кофактором для синтеза биологически активных форм факторов II, VII, IX, X, XIII и естественных антикоагулянтов, протеи-

stages of the disease has minor effect on the protein synthesis in liver cells. The hemostatic system is relatively resistant to developing intrahepatic cholestasis. Procoagulation, anticoagulation and fibrinolytic parameters in the early stages of the disease often remain within the normal values [15, 16].

Patients with cholestatic liver diseases are characterized by normal or increased coagulation. Higher level of plasminogen activation inhibitor 1 (PIA-1), may compensate the increased activity of the tissue plasminogen activator (tPA). Only in the later stages of the disease due to the long-term toxic effects of excess bile acids on the structure of the hepatocytes, their function including synthetic is corrupted. Therefore, in cholestatic liver diseases, changes in the blood coagulation system are less significant than they are for patients diagnosed with viral or alcoholic liver cirrhosis. Only at very late stages of the disease the hepatic cell failure and portal hypertension are developing. Survival in bleeding from varicose veins of the esophagus and stomach in patients with portal hypertension is higher than in non-cholestatic cirrhosis of the liver [17, 18].

In the coagulogram, there are elongations of thrombin time (TT) and normal values of both activated partial thromboplastin time (APTT) and prothrombin time (PT); the fibrinogen content remains within the normal range or increases. Due to the insufficient amount of bile acids entering the intestine in PSC and PBC, there is a decrease in the absorption of fat-soluble vitamins from the small intestine, including vitamin K. Vitamin K is a mandatory cofactor for the synthesis of biologically active forms of factors II, VII, IX, X, XIII and natural anticoagulants, proteins C and S. Vitamin K deficiency may affect the calcium-binding sites of the thrombin-thrombomodulin-protein C complex [19]. When the γ -carboxylation is damaged due to vitamin K deficiency or the action of its antagonists, inactive forms of these factors are formed.

There is evidence that hyperfibrinolysis may develop due to high levels of endotoxins in blood plasma [7, 20]. Until now, it remains problematic to predict whether hyperfibrinolysis might develop, which is not detected by laboratory tests in patients with cholestatic liver damage due to stress factors (infection, surgery). Despite the fact that patients with cholestatic liver diseases in the terminal stage of hepatic cell failure form inactive forms of clotting factors and may develop hyperfibrinolysis, they do not have a tendency to bleed [7]. On the contrary, activation of coagulation is a sign of alteration of the blood coagulation system in cholestatic liver diseases [21–24]. When conducting coagulation tests in patients with cholestatic liver diseases, the increases in platelet activity, Willebrand factor level and a decrease in the activity of ADAMTS-13 metalloproteinase are commonly found [22, 25, 26]. Pihusch R. et al. shown the platelet function to differ

нов С и S. Дефицит витамина К может влиять на кальций-связывающие сайты комплекса тромбин-тромбомодулин-белок С [19]. При нарушении γ -карбоксилирования вследствие дефицита витамина К или действия его антагонистов образуются неактивные формы этих факторов.

Имеются данные о том, что может развиваться гиперфибринолиз, обусловленный высоким уровнем эндотоксинов в плазме крови [7, 20]. До сих пор остается проблематичным предугадать, разовьется ли гиперфибринолиз, который лабораторно не выявляется у пациентов в стабильном состоянии с холестатическим повреждением печени, возникшими в результате воздействия стрессовых факторов (инфекция, оперативное вмешательство). Несмотря на то, что у пациентов с холестатическими заболеваниями печени в терминальной стадии печеночно-клеточной недостаточности образуются неактивные формы факторов свертывания и может развиваться гиперфибринолиз, склонности к кровотечениям у них не наблюдается [7]. Наоборот, признаками нарушения системы свертывания крови при холестатических заболеваниях печени является активация коагуляции [21–24]. При проведении коагуляционных тестов у пациентов с холестатическими заболеваниями печени часто отмечается увеличение активности тромбоцитов, уровня фактора Виллебранда и снижение активности металлопротеиназы ADAMTS-13 [22, 25, 26]. Pihusch R. et al. показали, что функция тромбоцитов различается у пациентов с холестатическим и нехолестатическим повреждением печени и является стабильной или даже гиперактивной у пациентов с ПСХ и ПБХ [22].

Тромбоэластография (ТЭГ) выявляет гиперкоагуляцию у пациентов ПСХ и ПБХ задолго до стадии развития цирроза, но не у пациентов с вирусным гепатитом С [22, 26]. Гиперкоагуляция по ТЭГ при ПСХ ассоциируется с более высоким уровнем фибриногена [22, 26]. При проведении рутинных коагуляционных тестов, у пациентов с холестатическими заболеваниями печени часто выявляется заметное повышение количества тромбоцитов и уровня фибриногена [21]. При этом считается, что высокая концентрация фибриногена у пациентов с холестатическими заболеваниями и гепатоцеллюлярной карциномой не ведет к повышению образования сгустков, так как большая часть его нефункциональна [27]. При этом было показано, что у пациентов с первичным билиарным холангитом обнаружена более высокая частота тромбозов в портальном венозном кровотоке. Ben-Ari Z. et al. использовали тромбоэластографию (ТЕГ) для оценки системы гемостаза у пациентов с ПСХ и ПБХ [21]. Тромбоэластография и тромбоэла-

in patients with cholestatic and noncholestatic liver damage and to be stable or even hyperactive in patients with PSC and PBC [22].

Thromboelastography (TEG) reveals the hypercoagulation in patients with PSC and PBC long before the stage of cirrhosis, but not in patients with viral hepatitis C [21, 22, 26]. Hypercoagulation by TAG in PBC and PSC patients is associated with higher fibrinogen levels [22, 26]. During routine coagulation tests, patients with cholestatic liver disease often demonstrate a marked increase in the number of platelets and fibrinogen levels [21]. At the same time, it is believed that the high concentration of fibrinogen in patients with cholestatic diseases and hepatocellular carcinoma does not lead to increased clot formation, since most of it is non-functional [27]. It was shown that patients with primary biliary cholangitis showed a higher incidence of thrombosis in the portal venous blood flow. Ben-Ari Z et al. employed TEG to assess the hemostatic system in patients with PSC and PBC [21]. TEG and thromboelastometry (ROTEM) are generally accepted coagulation tests that allow evaluating the specific components of the plasma coagulation system and blood cells [28, 29]. TEG allows determining the interaction of plasma coagulation factors, platelets and other blood cells. Based on the three parameters of the thromboelastogram, the authors showed that patients with PSC and PBC exhibit hypercoagulation (PBC 28%, PSC 43%) compared to patients with noncholestatic cirrhosis (5%), $P=0.005$ and $P=0.0005$, respectively, and compared with healthy volunteers ($P=0.005$ for PBC and $P=0.00001$ for PSC) [21].

Patients with PBC and PSC who experience hypercoagulability were found to possess a low level of natural anticoagulants (proteins S and C and/or antithrombin III [16, 30]. This is due to alterations of the protein-synthetic function of hepatocytes and a lack of vitamin K. Proteins C and S belong to vitamin K-dependent glycoproteins that are synthesized by hepatocytes. It is believed, that the low concentrations of vitamin K-dependent glycoproteins C and S may contribute to increased thrombosis. In cholestatic liver damage, an imbalance between decreased level of natural anticoagulants and decreased concentration of blood clotting factors leads to the development of hypercoagulation. The initiators of the development of hypercoagulation in cholestatic liver diseases can be bile acids, appearing in high concentrations in the common bloodstream. Normally, bile acids carry out enterohepatic circulation and practically do not get into the blood flow [31].

Getting into the common bloodstream, in patients with intrahepatic cholestasis the bile acids affect the phospholipid composition of the cytoplasmic membranes of the blood cells and vascular endothelium, breaking the transverse asymmetry

стометрия (ROTEM) являются общепринятыми тестами коагуляции, которые позволяют оценить свойства крови, содержащей все клетки крови и компоненты свертывающей системы плазмы [28, 29]. TEG позволяет определять взаимодействие плазменных факторов свертывания, тромбоцитов и других клеток крови. На основе трех параметров тромбоэластограммы, авторы показали, что у пациентов с ПСХ и ПБХ наблюдается гиперкоагуляция (ПБХ 28%, ПСХ 43%) по сравнению с пациентами, имеющими нехолестатический цирроз печени (5%), $p=0,005$ и $p=0,0005$ соответственно и по сравнению со здоровыми добровольцами ($p=0,005$ для ПБХ и $p=0,00001$ для ПСХ) [21].

У пациентов с ПСХ и ПБХ, у которых определяется гиперкоагуляция, также отмечается низкий уровень естественных антикоагулянтов (протеина S, С и/или антитромбина III) [16, 30]. Это обусловлено нарушением белково-синтетической функции гепатоцитов и недостатком витамина К. Протеины С и S — витамин-К-зависимые гликопротеины, синтезируются преимущественно гепатоцитами. Низкая концентрация витамин-К-зависимых гликопротеинов С и S может способствовать повышенному тромбообразованию. При холестатических повреждениях печени дисбаланс между снижением уровня естественных антикоагулянтов и снижением концентрации факторов свертывания крови приводит к развитию гиперкоагуляции. Инициаторами развития гиперкоагуляции при холестатических заболеваниях печени могут выступать желчные кислоты, появляющиеся в повышенной концентрации в общем кровотоке. В норме желчные кислоты осуществляют энтерогепатическую циркуляцию и в общий кровоток практически не попадают [31].

Попадая в общий кровоток, у пациентов с внутрипеченочным холестазом желчные кислоты способны влиять на фосфолипидный состав цитоплазматических мембран форменных элементов крови и эндотелия сосудов, нарушая поперечную асимметрию мембран. Желчные кислоты, являясь сильными детергентами, могут захватывать нейтральные фосфолипиды с внешнего лепестка цитоплазматической мембраны форменных элементов крови и эндотелиоцитов (рис.) При этом отрицательно заряженные фосфолипиды, могут «перескакивать» по механизму «flip-flop» с внутреннего лепестка цитоплазматической мембраны на внешний.

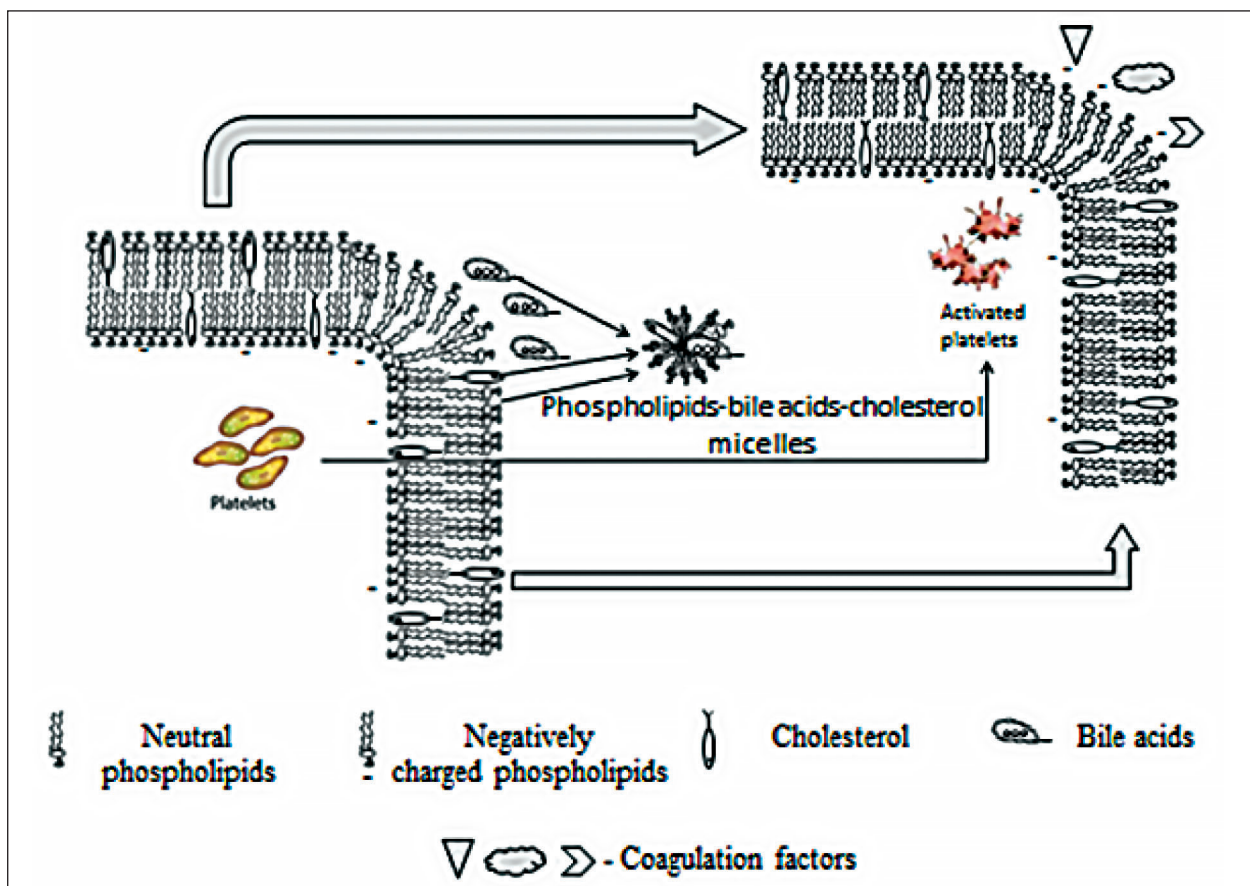
При нарушении поперечной асимметрии мембран тромбоцитов и эндотелиальных клеток сосудов на их поверхности формируются отрицательно заряженные (тромбогенные) участки и экспонируется апопротеин III тканевого фактора. Тканевой фактор (TF) и отрицательно

of the membranes. Bile acids, being strong detergents, can capture neutral phospholipids from the outer lobe of the cytoplasmic membrane of blood cells and endotheliocytes (Fig. 1). In this case, negatively charged phospholipids can «jump» by the mechanism of «flip-flop» from the inner lobe of the cytoplasmic membrane to the outer one.

When the transverse asymmetry of platelet membranes and vascular endothelial cells is altered, negatively charged (thrombogenic) areas are formed on their surface and tissue factor III apoprotein is exposed. Tissue factor (TF) and negatively charged phospholipids of the outer lobe of the cell membrane of platelets and endotheliocytes become available for plasma clotting factors. On the surface of the cytoplasmic membrane, the first enzyme complex of the procoagulant coagulation pathway is formed consisting of coagulation factor VII, TF and calcium cations Ca^{2+} (VII-TF- Ca^{2+}). The appearance of negatively charged phospholipids on the outer lobe of the cytoplasmic membrane leads to platelet activation, and changes in the phospholipid composition of endotheliocytes can promote adhesion of activated platelets on the vascular wall and trigger the process of thrombosis.

The loss of asymmetry of phospholipids with exposure to phosphatidylserine (PS) on the outer lobe of cell membranes is important for the formation of microparticles (MP) expressing TF and PS on their surface simultaneously [32, 33]. TF is the main physiological initiator of coagulation *in vivo* through its interaction with coagulation factor VII/VIIa protease and is expressed by most cellular components of the vascular wall [34]. Exposure of both PS and TF on the cell membranes can explain their procoagulant activities in blood. An increased amount of TF+ and PS+ MPs in blood plasma has been demonstrated in a number of prethrombotic conditions [32, 35].

It is known that a number of substances, such as endotoxins or cytokines, can act as specific stimulators of induction of MP formation [36]. However, to date, there are no data on the contribution of MPs to the imbalance of the hemostatic system during development of hypercoagulation in patients with cholestatic liver diseases. It can be assumed that in these patients, due to the appearance of an increased content of bile acids in the systemic circulation, an excess amount of MPs enriched with TF+ and PS+ is formed. Loss of asymmetry of phospholipids in platelets and endotheliocytes can lead to blebbing of membranes with formation and release of MPs [32]. The surface of MPs formed due to platelet blebbing has 50–100 times greater procoagulant activity than the surface of activated platelets [37]. It is believed that studies of MPs in cholestatic liver diseases can aid to clarify the mechanism of increased risk of thrombosis in these patients.



Модель активации мембран тромбоцитов и эндотелиоцитов желчными кислотами при холестатических заболеваниях печени (объяснение в тексте).

Model of activation of platelet and endothelial cell membranes by bile acids in cholestatic liver diseases (explanation in the text).

Примечание. Activated platelets — активированные тромбоциты; phospholipids-bile acids-cholesterol micelles — мицеллы, состоящие из фосфолипидов, желчных кислот, холестерина; neutral phospholipids — нейтральные фосфолипиды; negatively charged phospholipids — отрицательно заряженные фосфолипиды; coagulation factors — факторы коагуляции.

заряженные фосфолипиды внешнего лепестка клеточной мембраны тромбоцитов и эндотелиоцитов становятся доступными для плазменных факторов свертывания крови. На поверхности цитоплазматической мембраны может формироваться первый ферментный комплекс прокоагулянтного пути свертывания крови, состоящий из фактора VII свертывания, TF и катионов кальция Ca^{2+} (VII-TF-Ca^{2+}). Появление отрицательно заряженных фосфолипидов на внешнем лепестке цитоплазматической мембраны приводит к активации тромбоцитов, а изменения в фосфолипидном составе эндотелиоцитов могут способствовать адгезии активированных тромбоцитов на сосудистой стенке и запускать процесс тромбообразования.

Потеря асимметрии фосфолипидов с экспозицией фосфатидилсерин (PS) на внешнем лепестке клеточных мембран представляется важным для формирования микрочастицы (МЧ) с наличием на их поверхности одновременно TF+ и PS+ [32, 33]. TF является основным физиологическим инициатором коагуляции *in vivo* через его взаимодействие с протеазой фактора свертывания

In the early stages of cholestatic liver diseases, bile acids accumulating in the general bloodstream undergo compensatory glucuronidation (by the enzyme UDP-glucuronyltransferase) and sulfation (by the enzyme sulfotransferase) [10]. This diminishes the detergent properties of bile acids. Therefore, during this period, changes in the hemostatic system in patients with PSC and PBC may be minimal and practically undetectable [38]. Conservation of the protein synthesis function of hepatocytes allows for maintenance of the balance between procoagulant and anticoagulant components of the blood coagulation system [39].

Whereas the disease progresses the concentration of bile acids in the general bloodstream increases. At the same time, the intensity of their glucuronidation and sulfation in hepatic cells may be decreased due to hepatocyte dysfunction caused by enhanced intrahepatic cholestasis [10]. In the terminal stage of cholestatic diseases requiring organ transplantation, an increasing number of unconjugated bile acids may appear in the general bloodstream. The latter possess maximum detergent properties compared to conjugated bile acids. A

вания VII/VIIa и экспрессируется большинством клеточных компонентов сосудистой стенки [34]. Как экспозицией фосфатидилсерина, так и наличием тканевого фактора в мембранах МЧ можно объяснить их прокоагулянтные свойства. Повышенное количество TF+ и PS+ МЧ в плазме крови было зарегистрировано при ряде предтромботических состояний [32, 35].

Известно, что ряд веществ, таких как эндотоксины или цитокины, могут выступать в качестве специфических стимуляторов индукции образования МЧ [36]. Однако на сегодняшний день отсутствуют данные об участии микрочастиц в дисбалансе системы гемостаза при развитии гиперкоагуляции у пациентов с холестатическими заболеваниями печени. Можно предположить, что у этих пациентов вследствие появления повышенного содержания желчных кислот в системном кровотоке образуется избыточное количество МЧ, обогащенных TF+ и PS+. Потеря асимметрии фосфолипидов в тромбоцитах и эндотелиоцитах может приводить к блеббингу мембран с образованием и высвобождением МЧ [32]. Поверхность микрочастиц, образовавшихся в результате блеббинга тромбоцитов, обладает в 50–100 раз большей прокоагулянтной активностью, чем поверхность самих активированных тромбоцитов [37]. Изучение МЧ при холестатических заболеваниях печени может помочь понять механизм развития склонности к тромбообразованию у этих пациентов.

На ранних этапах холестатических заболеваний печени накапливающиеся в общем кровотоке желчные кислоты подвергаются компенсаторному глюкуронированию (ферментом УДФ-глюкуронилтрансферазой) и сульфатированию (ферментом сульфотрансферазой) [10]. Это уменьшает детергентные свойства желчных кислот. Поэтому в этот период изменения в системе гемостаза у пациентов с ПСХ и ПБХ могут быть минимальными и практически не выявляться [38], а сохраняющаяся белково-синтетическая функция гепатоцитов позволяет поддерживать в равновесии прокоагулянтную и антикоагулянтную систему свертывания крови [39].

По мере прогрессирования заболевания происходит увеличение концентрации желчных кислот в общем кровотоке. При этом интенсивность процесса их глюкуронирования и сульфатирования в печеночных клетках может уменьшаться вследствие нарушения функции гепатоцитов, вызванного возрастающим внутрипеченочным холестазом [10]. В терминальной стадии холестатических заболеваний, требующих трансплантации органа, в общем кровотоке может появляться все большее количество неконъюгированных желчных

significant increase in the concentration of unconjugated bile acids in the general bloodstream can cause significant changes in the phospholipid composition of the cytoplasmic membranes of endotheliocytes and blood elements including platelets. During this period, the imbalance between the procoagulant and anticoagulant systems may further increase due to the development of severe hepatic cell insufficiency and impaired absorption of vitamin K. Alteration of transverse asymmetry of platelet membranes, endothelial cells and skewing the imbalance toward the procoagulant system can lead to activation of thrombus formation.

Patients with PSC and PBC are characterized by better survival after bleeding from varicose veins of the esophagus and stomach, as well as decreased blood loss during orthotopic liver transplantation, compared to patients with non-cholestatic liver diseases [40]. Liver transplantation in patients with PSC and PBC is performed relatively easier than in patients with viral and alcoholic cirrhosis or fulminant liver failure. Post-transplant outcomes in patients with PSC and PBC are more favorable compared to viral hepatitis and alcohol-associated liver disease [41, 42]. In patients with PSC and PBC the liver is only slightly enlarged in size, portal hypertension is not evident, and there are no developed fragile venous (portocaval) collaterals on the abdominal wall and in the abdominal cavity. All this contributes to significantly less blood loss in these patients during liver transplantation than in patients with non-cholestatic cirrhosis. The best long-term outcome in surviving and earlier rehabilitation of recipients were achieved in PSC patients and PBC patients [41–45].

Liver damage associated with hepatic artery, portal and hepatic veins thrombosis (Antiphospholipid syndrome, Budd Chiari disease), and hemostasis. Prothrombotic conditions may constitute a background of disorders of the hemostatic system in liver diseases [46]. The underlying causes of portal vein thrombosis (PVT) are recognized as multifactorial ones that include malignancies, progressive chronic liver diseases, and acquired and congenital thrombophilia [47]. Studies revealed that thrombophilia represents a significant risk for developing portal vein thrombosis in non-cirrhotic patients [48, 49].

Thrombosis of the hepatic veins in antiphospholipid syndrome, Budd–Chiari syndrome or malignant liver tumors may lead to severely impaired liver function that may require liver transplantation. Various studies have identified congenital and acquired disorders that serve as predisposing factors PVT development in patients with cirrhosis [50–54].

Development of thrombosis may stem from acquired and genetically determined thrombophilia cases. Most common hereditary risk factors for

кислот. Последние обладают максимальными детергентными свойствами по сравнению с конъюгированными желчными кислотами. Значительное увеличение концентрации неконъюгированных желчных кислот в общем кровотоке способно вызвать существенные изменения фосфолипидного состава цитоплазматических мембран форменных элементов крови, в том числе тромбоцитов и эндотелиоцитов. В этот период может усиливаться дисбаланс между прокоагулянтной и антикоагулянтной системами гемостаза за счет развития выраженной печеночно-клеточной недостаточности и нарушения всасывания витамина К. Нарушение поперечной асимметрии мембран тромбоцитов, эндотелиальных клеток и дисбаланс в пользу прокоагулянтной системы могут приводить к активации тромбообразования.

Отмечено, что пациенты с ПСХ и ПБХ характеризуются лучшей выживаемостью после кровотечений из варикозно расширенных вен пищевода и желудка, а также меньшей кровопотерей при выполнении ортотопической трансплантации печени, по сравнению с пациентами с нехолестатическими заболеваниями печени [40]. Хирургически трансплантация печени у пациентов с ПСХ и ПБХ относительно проще, чем при циррозах печени вирусной, алкогольной этиологии и фульминантной печеночной недостаточности. Посттрансплантационные исходы у пациентов с ПСХ и ПБХ более благоприятны по сравнению с вирусным гепатитом и алкоголь-ассоциированным заболеванием печени [41, 42]. При ПСХ и ПБХ печень незначительно увеличена в размерах, портальная гипертензия не выражена, отсутствуют развитые хрупкие венозные (портокавальные) коллатерали на брюшной стенке и в брюшной полости. Все это способствует значительно меньшей кровопотере у этих пациентов при трансплантации печени, чем у пациентов с нехолестатическими циррозами. Наилучшие показатели многолетнего выживания и реабилитации реципиентов достигнуты именно при ПСХ и ПБХ [41–45].

Повреждения печени, связанные с тромбозом печеночной артерии, воротной и печеночных вен (антифосфолипидный синдром, болезнь Бадда-Киари) и гемостаз. Протромботические состояния могут быть фоном нарушений в системе гемостаза при болезнях печени [46]. Основные причины тромбоза воротной вены часто многофакторные и включают злокачественные новообразования, прогрессирующие хронические холестатические заболевания печени, а также приобретенные и наследственные тромбофилии [47]. Тромбофилии являются значительным фактором риска развития тромбоза воротной вены у нецирро-

thrombosis include genes encoding inherent forms of thrombophilia [55, 56]. They include factor V Leiden G1691A mutation; prothrombin G20210A mutation; mutation C677T, gene methyltetrahydrofolate reductase, hyperhomocysteinemia; protein S and protein C antithrombin deficiency, increased activity and amount of factor VIII [57–59].

Genetic defects of coagulation-anticoagulation result in prothrombotic state, which is likely to relate to the increasing synthesis of von Willebrand factor by endothelial cells, increased level of factor VIII combined with low levels of hepatic anticoagulation factors — proteins C and S, and antithrombin III [60, 61].

The most common acquired risk factors for thrombosis include myeloproliferative disorders and antiphospholipid antibodies (aPL). The detection of aPL commonly results in diagnosis of antiphospholipid syndrome (APS) [62]. APS represents an acquired thrombophilic disorder with autoantibodies to a variety of phospholipid determinants of cell membranes or phospholipid binding proteins [58, 62–65]. In the coagulogram of patients with APS, thrombocytopenia is common, prolongation of the clotting time of phospholipid-dependent tests is frequently observed that includes activated partial thromboplastin time coagulation time determined by Russell's viper poison [66]. Hypocoagulation diagnosed by the *in vitro* coagulation testing is associated *in vivo* with thrombosis, not bleeding, even when presenting along with thrombocytopenia.

So far the mechanism of activation of thrombus formation in patients with APS has not been clarified. aPL significantly contribute to initiation of thrombus formation by APS. aPL represent extremely heterogeneous population of autoantibodies, each of which has its unique epitope specificity and pathogenic potential [62–67]. In the bloodstream, aPL can bind to membranes of blood cells and endothelial cells, changing the phospholipid composition of the outer leaflet of the plasma membrane. Presumably, aPL through interaction with endothelial cells and platelets may act as signaling molecules triggering Ca^{2+} -dependent regulatory systems that drive thrombogenesis.

Indeed, the increase in the content of Ca^{2+} in the cytoplasm might inhibit the ATP-dependent aminophospholipid transferase. The latter contributes to maintaining the transverse asymmetry of membranes since it transfers phosphatidylserine from the outer leaflet of the phospholipid bilayer into the inner one. Decreasing the activity of aminophospholipid transferase will lead to an increased exposition of PS at the outer leaflet of plasma membrane and the formation of negatively charged patches necessary for the formation of membrane enzyme complexes. As a result of this disruption of the plasma membrane structure, the tissue factor becomes ex-

тических пациентов [48, 49]. Тромбоз печеночных вен при антифосфолипидном синдроме, синдроме Бадда–Киари может привести к нарушению функции гепатоцитов, требующей трансплантации печени. Ряд исследований выявили наследственные и приобретенные нарушения в системе гемостаза, как предрасполагающие факторы для тромбообразования в воротной вене у пациентов с циррозом [50–54].

Различают приобретенные и генетически обусловленные тромбофилии, приводящие к развитию тромбозов. К наиболее распространенным наследственным факторам риска тромбоза относятся гены, кодирующие врожденные формы тромбофилии [55, 56], а именно мутация G1691A фактора V Лейдена, мутация G20210A протромбина, мутация C677T гена метилтетрагидрофолатредуктазы (повышенный риск гипергомоцистеинемии), дефицит белков S и C, а также антитромбина, вызывающих повышенную активность и количество фактора VIII [57–59].

Генетические дефекты, включающие коагуляционно-антикоагуляционный баланс, могут приводить к протромботическому состоянию. Последнее обусловлено усилением синтеза эндотелиальными клетками фактора Виллебранда и повышением уровня фактора VIII в сочетании с низким уровнем антитромбина III и факторов антикоагуляции — белков C и S, синтезируемых в печени [60, 61].

К наиболее часто встречающимся приобретенным факторам риска тромбоза относят миелопролиферативные заболевания и антифосфолипидные антитела (aPL). Выявление aPL является признаком развития определенного симптомокомплекса — антифосфолипидного синдрома (АФС) [62]. АФС — заболевание, относящееся к приобретенной тромбофилии с аутоантителами к различным комплексам фосфолипидных детерминант клеточных мембран и фосфолипидсвязывающим белкам [58, 62–65]. В коагулограмме пациентов с АФС нередко наблюдается тромбоцитопения, удлинение времени свёртывания фосфолипидзависимых тестов: АЧТВ, времени свёртывания с ядом гадюки Рассела [66]. Отмечаемая в тестах свёртывания *in vitro* выраженная гипокоагуляция, ассоциируется *in vivo* не с кровоточивостью, а с тромбозами даже на фоне тромбоцитопении. Наиболее часто среди ненаследственных причин повышения свертывания крови — наличие в крови aPL [62–65]. Известно значительное число заболеваний, при которых в крови выявляются aPL [58, 66, 67]. Выявление aPL при некоторых ятрогенных состояниях, а также у 0,2% здорового населения свидетельствует не только о наличии различных их субтипов, но и возможности существования как фонового

posed on its outer surface, and the first enzyme complex of the procoagulant blood-clotting pathway VII-TF- Ca^{2+} is formed. The same changes can occur on the outer leaflets of plasma membrane of platelets to promote their activation, adhesion and aggregation on the endothelial wall [68, 69]. Despite thrombocytopenia, activation of platelets close to endothelial wall of the vessel may be enough to trigger thrombosis generation. APS is characterized by a hypercoagulable state that can result in thrombosis in any vascular segment [70].

There are several reports on the association between antiphospholipid antibodies (APA) and the development of the Budd–Chiari syndrome (BCS) [71–73]. BCS is a disorder of blood outflow from the liver caused by primary obliterating thrombophlebitis, malformations of the hepatic veins, their thrombosis following the disease, characterized by liver damage and the development of portal hypertension [74–76]. BCS is a rare disease with fatal outcome if no optimal treatment has been prescribed. The classical BCS is a clinical and pathological entity characterized by structural and functional liver abnormalities due to obstruction of the hepatic venous blood outflow [76].

Pathogenetic role of the aPL in the development of BCS remains controversial. It is believed that the liver cells severely injured because of obstruction of venous outflow induce production of self-directed autoantibodies as a response to liver damage [77]. The identification of these antibodies before the development of BCS, however, provides the proof that the production of the aPL may not result from autoimmune responses secondary to liver injury [78].

Management of BCS, from simple medical treatment to liver transplantation, depends on the acute and chronic evolution of the disease and on the degree of hepatic insufficiency. BCS in patients progressing to cirrhosis is an indication for liver transplantation [79].

Mutations of the gene encoding the prothrombin molecule is the most frequent (22% of cases) cause of portal vein thrombosis in patients without cirrhosis. Mutant gene for factor V in 20% of cases is the cause of thrombosis of the hepatic veins. Genetically determined protein C deficiency is found in 20% of patients with Budd–Chiari syndrome, and congenital deficit of protein S occur in 7% of patients with primary sclerosing cholangitis or portal vein thrombosis [80, 81]. Patients with factor V inhibitors may be clinically asymptomatic, possess mild to severe bleeding symptoms, and develop thrombosis. Three cases of factor V inhibitor have been reported to be associated with liver transplantation [82].

Conclusion

Patients with cholestatic liver disease, specifically in the terminal stage of the disease, have hemostatic defects that affect the hemostatic sys-

состояния и достаточной компенсации системы гемостаза до определенного периода. Присоединение других традиционных факторов тромбоза может привести к декомпенсации системы гемостаза.

Механизм активации тромбообразования у пациентов с АФС до последнего времени не совсем ясен. В инициации тромбообразования при АФС важную роль играют антифосфолипидные антитела. aPL представляют собой чрезвычайно гетерогенную популяцию аутоантител, каждая из которых обладает уникальным эпитопом специфичности и патогенным потенциалом [68]. Находясь в общем кровотоке, aPL могут связываться с мембранами форменных элементов крови и эндотелиоцитов, изменяя фосфолипидный состав внешнего лепестка цитоплазматической мембраны этих клеток. Возможно, что aPL выступают сигнальными молекулами, запускающими тромбогенез. Можно предположить, что их взаимодействие с эндотелиальными клетками и тромбоцитами способствует активации Ca^{2+} -зависимых регуляторных систем. Это может приводить к повышению содержания в цитоплазме Ca^{2+} , который ингибирует АТФ-зависимую аминокислототрансферазу. Этот фермент играет важную роль в сохранении поперечной асимметрии мембран, так как переносит фосфатидилсерин с внешнего лепестка фосфолипидного бислоя во внутренний. Снижение активности аминокислототрансферазы может приводить к увеличению содержания во внешнем лепестке цитоплазматической мембраны фосфатидилсерина и образованию отрицательно заряженных участков, необходимых для формирования мембранных ферментных комплексов. Кроме того, в результате такого нарушения структуры плазматической мембраны на её внешней поверхности экспонируется тканевой фактор и формируется первый ферментный комплекс прокоагулянтного пути свёртывания крови VII-TF- Ca^{2+} . Такие же изменения могут происходить и на цитоплазматической мембране тромбоцитов, что может способствовать их активации, адгезии и агрегации на сосудистой стенке [68, 69]. Поэтому, несмотря на тромбоцитопению, активированных тромбоцитов может оказаться достаточно для запуска тромбообразования. АФС характеризуется гиперкоагуляционным состоянием, которое может привести к тромбозу в любом сегменте сосудистого русла [70].

Имеются данные о связи между антифосфолипидными антителами (aPL) и развитием синдрома Бадда-Киари (СБК) [71–73]. Под последним понимают нарушение оттока крови из печени, обусловленное первичным облитерирующим тромбофлебитом, пороками разви-

tem. Severity of these defects depends on the degree of liver damage. Lismann T. et al. suggested concept of a compensatory balanced of the hemostatic system in liver damages due to various causes [83, 84]. Despite the frequently revealed changes in routine coagulation tests in patients with hepatic failure, the hemostatic system is rather balanced by compensatory mechanisms. An imbalance toward the dominance of hypocoagulation or hypercoagulation occurs in certain clinical conditions, most commonly in terminal stage of hepatic failure. One of the possible causes of hypercoagulation in patients with PSC and PBC is an increased content of bile acids in the common bloodstream [85]. The mechanisms underlying the development of thrombotic conditions in patients with cholestatic liver diseases — PSC and PBC, which may be useful in correcting the hemostatic system in these patients, are proposed. Detecting high levels of aPL in patients with thrombotic complications pre-surgery might warrant a need for their determination post-surgery. Timely performance of thromboelastography and thromboelastometry in patients with cholestatic liver diseases, as well as laboratory monitoring of hemostasis will aid to intine preventing the thrombotic complications and improving the quality of life of the patients.

тия печеночных вен, их тромбозом с последующей окклюзией, характеризующееся повреждением печени и развитием портальной гипертензии [74–76]. СБК — редкое заболевание с потенциально летальным исходом без проведения оптимального лечения. Классический СБК характеризуется клинической картиной со структурно-функциональными изменениями печени вследствие нарушения проходимости печеночного венозного кровотока [76].

Патогенетическая роль aPL в развитии СБК остаётся спорной. Имеется мнение о том, что клетки печени, поврежденные при обструкции венозного оттока, могут индуцировать выработку аутоантител [77]. В тоже время выявление этих антител до развития СБК является доказательством того, что продукция aPL не является следствием повреждения печени [78]. СБК у пациентов с прогрессирующим циррозом является показанием к трансплантации печени [79].

Мутация гена, кодирующего протромбин, является наиболее частой (22% случаев) причиной тромбоза воротной вены у пациентов без цирроза. Мутация гена, кодирующего фактор V, в 20% случаев является причиной тромбоза печеночных вен. Генетически обусловленный дефицит протеина С обнаруживается у 20% пациентов с СБК, а протеина S — у 7% пациентов с первичным склерозирующим холангитом или тромбозом воротной вены [80, 81]. Пациен-

ты с мутацией фактора V Лейдена могут быть клинически бессимптомны, иметь симптомы кровотечения от легкой до тяжелой степени, а также у них возможно развитие тромбозов [82].

Заключение

Пациенты с холестатическими заболеваниями печени, особенно в терминальной стадии заболевания, имеют гемостатические дефекты, которые затрагивают многие звенья системы гемостаза, и тяжесть которых зависит от степени повреждения печени. Lisman T. et al. высказали концепцию о компенсаторной сбалансированности системы гемостаза при повреждениях печени различной этиологии [83, 84]. Несмотря на часто выявляемые изменения в рутинных коагуляционных тестах у пациентов с печеночно-клеточной недостаточностью имеет место скомпенсированный баланс в системе гемостаза. Однако такие пациенты имеют достаточно узкий «коридор» для поддержания гемостатического баланса, и существу-

ющее равновесие легко может трансформироваться у пациентов с холестатическими заболеваниями печени в состояние гиперкоагуляции. Одной из возможных причин гиперкоагуляции у пациентов с ПСХ и ПБХ является повышенное содержание желчных кислот в общем кровотоке [85]. Предложены механизмы, лежащие в основе развития тромботических состояний у больных холестатическими заболеваниями печени — ПСХ и ПБХ, которые могут быть полезны при коррекции системы гемостаза у этих пациентов. Выявление высоких уровней aPL у пациентов с тромботическими осложнениями до операции свидетельствует о необходимости их определения в послеоперационном периоде. Своевременное выполнение тромбоэластографии и тромбоэластометрии пациентам с холестатическими заболеваниями печени, а также лабораторное выявление имеющихся у них дефектов системы гемостаза будет способствовать предотвращению тромботических осложнений и улучшению качества их жизни.

Литература

1. Батырова А.С., Баканов М.И., Сурков А.Н. Современные представления о системе гемостаза при хронических заболеваниях печени (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика* 2015; 60 (8): 40–44.
2. Решетняк В.И., Маев И.В., Решетняк Т.М., Журавель С.В., Писарев В.М. Заболевания печени и гемостаз. Часть I. Холестатические заболевания печени и гемостаз (обзор). *Общая реаниматология*. 2019; 15 (5): 74–87. DOI: 10.15360/1813-9779-2019-5-74-87.
3. Intagliata N.M., Caldwell S.H. Changes in hemostasis in liver disease. *J. Hepatol.* 2017 Dec; 67 (6): 1332–1333. DOI: 10.1016/j.jhep.2017.07.001. PMID: 29156209.
4. Tripodi A. Hemostasis in Acute and Chronic Liver Disease. *Semin Liver Dis.* 2017; 37 (1): 28–32. DOI: 10.1055/s-0036-1597770. PMID: 28201846
5. Flores B., Trivedi H.D., Robson S.C., Bonder A. Hemostasis, bleeding and thrombosis in liver disease. *J. Transl. Sci.* 2017; 3 (3). DOI: 10.15761/JTS.1000182. PMID: 30221012
6. Минов А.Ф., Дзядзько А.М., Руммо О.О. Нарушение гемостаза при заболеваниях печени. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2010; 2 (12): 82–91.
7. Морозов Ю.А., Медников Р.В., Чарная М.А. Нарушения системы гемостаза при патологии печени и их диагностика. *Геморрагические диатезы, тромбозы, тромбофилии*. 2014; 1: 162–174.
8. Sira J., Eyre L. Physiology of Hemostasis. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*. 2016; 17 (2): 79–82.
9. Beuers U., Gershwin M.E., Gish R.G., Invernizzi P., Jones D.E., Lindor K., Ma X., Mackay I.R., Parés A., Tanaka A., Vierling J.M., Poupon R. Changing nomenclature for PBC: From 'cirrhosis' to 'cholangitis'. *Hepatology* 2015; 62: 1620–1622. DOI: 10.1002/hep.28140. PMID: 26372460
10. Reshetnyak V.I. Concept on the pathogenesis and treatment of primary biliary cirrhosis. *World J Gastroenterol.* 2006; 12: 7250–7262. DOI: 10.3748/wjg.v12.i45.7250. PMID: 17143938
11. Reshetnyak V.I. Primary biliary cirrhosis: clinical and laboratory criteria for its diagnosis. *World J Gastroenterol* 2015; 21: 7683–7708. DOI: 10.3748/wjg.v21.i25.7683. PMID: 26167070
12. Gerussi A., Cristofori L., Carbone M., Asselta R., Invernizzi P. The immunobiology of female predominance in primary biliary cholangitis. *Journal of Autoimmunity* 2018; 95: 124–132. DOI: 10.1016/j.jaut.2018.10.015. PMID: 30509386
13. Lindor K.D., Bowlus C.L., Boyer J., Levy C., Mayo M. Primary Biliary Cholangitis: 2018 Practice Guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*. 2018 Aug 2. DOI: 10.1002/hep.30145. PMID: 30070375
14. Ueda Y., Kaido T., Okajima H., Hata K., Anazawa T., Yoshizawa A., Yagi S., Taura K., Masui T., Yamashiki N., Haga H., Nagao M., Marusawa H., Seno H., Uemoto S. Long-term prognosis and recurrence of primary sclerosing cholangitis after liver transplantation: a single-center experience. *Transplant Direct* 2017; 3: e334. DOI: 10.1097/TXD.0000000000000751. PMID: 29536035
15. Тугушев А.С. Цирроз печени и тромбоз. *Запорожский медицинский журнал*. 2010; 3 (12): 78–83.
16. Козловский В.И., Ковтун О.С., Сероухова О.П., Детковская И.Н., Козловский И.В. Методы исследования и клиническое значение

References

1. Batyrova A.S., Bakanov M.I., Surkov A.N. Modern views on the hemostatic system in chronic liver diseases (literature review). *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika* 2015; 60 (8): 40–44 [In Russ.]
2. Reshetnyak V.I., Maev I.V., Reshetnyak T.M., Zhuravel S.V., Pisarev V.M. Liver Diseases and the Hemostasis (Review) Part 1. Non-Cholestatic Diseases of the Liver and Hemostasis. *Obshchaya Reanimatologiya=General Reanimatology*. 2019; 15 (5): 74–87. [In Russ.] DOI: 10.15360/1813-9779-2019-5-74-87.
3. Intagliata N.M., Caldwell S.H. Changes in hemostasis in liver disease. *J. Hepatol.* 2017 Dec; 67 (6): 1332–1333. DOI: 10.1016/j.jhep.2017.07.001. PMID: 29156209.
4. Tripodi A. Hemostasis in Acute and Chronic Liver Disease. *Semin Liver Dis.* 2017; 37 (1): 28–32. DOI: 10.1055/s-0036-1597770. PMID: 28201846
5. Flores B., Trivedi H.D., Robson S.C., Bonder A. Hemostasis, bleeding and thrombosis in liver disease. *J. Transl. Sci.* 2017; 3 (3). DOI: 10.15761/JTS.1000182. PMID: 30221012
6. Minov A.F., Dzyadko A.M., Rummo O.O. Violation of hemostasis in liver diseases. *Vestnik transplantologii i iskusstvennykh organov*. 2010; 2 (12): 82–91 [In Russ.]
7. Morozov Yu.A., Mednikov R.V., Charnaya M.A. Violations of the hemostatic system in liver pathology and their diagnosis. *Gemorragicheskie diatezy, trombozy, trombofilii*. 2014; 1: 162–174 [In Russ.]
8. Sira J., Eyre L. Physiology of Hemostasis. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*. 2016; 17 (2): 79–82
9. Beuers U., Gershwin M.E., Gish R.G., Invernizzi P., Jones D.E., Lindor K., Ma X., Mackay I.R., Parés A., Tanaka A., Vierling J.M., Poupon R. Changing nomenclature for PBC: From 'cirrhosis' to 'cholangitis'. *Hepatology* 2015; 62: 1620–1622. DOI: 10.1002/hep.28140. PMID: 26372460
10. Reshetnyak V.I. Concept on the pathogenesis and treatment of primary biliary cirrhosis. *World J Gastroenterol.* 2006; 12: 7250–7262. DOI: 10.3748/wjg.v12.i45.7250. PMID: 17143938
11. Reshetnyak V.I. Primary biliary cirrhosis: clinical and laboratory criteria for its diagnosis. *World J Gastroenterol* 2015; 21: 7683–7708. DOI: 10.3748/wjg.v21.i25.7683. PMID: 26167070
12. Gerussi A., Cristofori L., Carbone M., Asselta R., Invernizzi P. The immunobiology of female predominance in primary biliary cholangitis. *Journal of Autoimmunity* 2018; 95: 124–132. DOI: 10.1016/j.jaut.2018.10.015. PMID: 30509386
13. Lindor K.D., Bowlus C.L., Boyer J., Levy C., Mayo M. Primary Biliary Cholangitis: 2018 Practice Guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*. 2018 Aug 2. DOI: 10.1002/hep.30145. PMID: 30070375
14. Ueda Y., Kaido T., Okajima H., Hata K., Anazawa T., Yoshizawa A., Yagi S., Taura K., Masui T., Yamashiki N., Haga H., Nagao M., Marusawa H., Seno H., Uemoto S. Long-term prognosis and recurrence of primary sclerosing cholangitis after liver transplantation: a single-center experience. *Transplant Direct* 2017; 3: e334. DOI: 10.1097/TXD.0000000000000751. PMID: 29536035
15. Tugushev A.S. Liver cirrhosis and thrombosis. *Zaporozhskij meditsinskij zhurnal*. 2010; 3 (12): 78–83. [In Russ.]
16. Kozlovskij V.I., Kovtun O.S., Seroukhova O.P., Detkovskaya I.N., Kozlovskij I.V. Research methods and clinical significance of platelet ag-

- агрегации тромбоцитов. Фокус на спонтанную агрегацию. *Вестник ВГМУ*. 2013; 3: 79–91.
17. Gores G.J., Wiesner R.H., Dickson E.R., Zinsmeister A.R., Jorgensen R.A., Langworthy A. Prospective evaluation of esophageal varices in primary biliary cirrhosis: development, natural history and influence on survival. *Gastroenterology* 1989; 96: 1552–1559. DOI: 10.1016/0016-5085 (89)90526-X. PMID: 2785470
 18. Biagini M.R., Guardascione M., McCormick A.P., Raskino C., McIntyre N., Burroughs A.K. Bleeding varices in PBC and its prognostic significance. *Gut* 1990; 31: A1209. DOI: 10.1016/0168-8278 (90)91361-Y
 19. Yang L., Rezaie A.R. Calcium-binding sites of the thrombin-thrombomodulin-protein C complex: possible implications for the effect of platelet factor 4 on the activation of vitamin K-dependent coagulation factors. *Thromb Haemost.* 2007; 97 (6): 899–906. PMID: 17549291
 20. Agarwal S., Joyner K.A. Jr, Swaim M.W. Ascites fluid as a possible origin for hyperfibrinolysis in advanced liver disease. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 3218–3224. DOI: 10.1111/j.1572-0241.2000.03299.x. PMID: 11095345
 21. Ben-Ari Z., Panagou M., Patch D., Bates S., Osman E., Pasi J., Burroughs A. Hypercoagulability in patients with primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis evaluated by thrombelastography. *J Hepatol* 1997; 26: 554–559. DOI: 10.1016/S0168-8278 (97)80420-5. PMID: 9075662
 22. Pihusch R., Rank A., Göhring P., Pihusch M., Hiller E., Beuers U. Platelet function rather than plasmatic coagulation explains hypercoagulable state in cholestatic liver disease. *J. Hepatol* 2002; 37: 548–555. DOI: 10.1016/S0168-8278 (02)00239-8. PMID: 12399218
 23. Sullivan B.P., Weinreb P.H., Violette S.M., Luyendyk J.P. The coagulation system contributes to alphaVbeta6-integrin expression and liver fibrosis induced by cholestasis. *Am. J. Pathol* 2010; 177: 2837–2849. DOI: 10.2353/ajpath.2010.100425. PMID: 21037076
 24. Joshi N., Kopec A.K., O'Brien K.M., Towery K.L., Cline-Fedewa H., Williams K.J., Copple B.L., Flick M.J., Luyendyk J.P. Coagulation-driven platelet activation reduces cholestatic liver injury and fibrosis in mice. *J. Thromb. Haemost.* 2015; 13: 57–71. DOI: 10.1111/jth.12770. PMID: 25353084
 25. Hartmann M., Szalai C., Saner F.H. Hemostasis in liver transplantation: Pathophysiology, monitoring, and treatment. *World J. Gastroenterol.* 2016; 22 (4): 1541–1550. DOI: 10.3748/wjg.v22.i4.1541. PMID: 26819521
 26. Krzanicki D., Sugavanam A., Mallett S. Intraoperative hypercoagulability during liver transplantation as demonstrated by thromboelastography. *Liver Transpl.* 2013; 19 (8): 852–861. DOI: 10.1002/lt.23668. PMID: 23696318
 27. Francis J.L., Armstrong D.J. Fibrinogen-bound sialic acid levels in the dysfibrinogenemia of liver disease. *Haemostasis* 1982; 11: 215–222. DOI: 10.1159/000214666. PMID: 6290353
 28. Dumitrescu G., Januszkiewicz A., Ågren A., Magnusson M., Wahlin S., Wernerman J. Thrombelastometry: relation to the severity of liver cirrhosis in patients considered for liver transplantation. *Medicine (Baltimore)* 2017; 96: e7101. DOI: 10.1097/MD.00000000000007101. PMID: 28591054
 29. Shaydakov M.E., Blebea J. Thromboelastography (TEG). StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019. PMID: 30725746
 30. Mannucci P.M., Vigano S. Deficiencies of protein C, an inhibitor of blood coagulation. *Lancet* 1982; 2: 463–467. DOI: 10.1016/S0140-6736 (82)90494-9. PMID: 6125639
 31. Reshetnyak V.I. Physiological and molecular biochemical mechanisms of bile formation. *World J Gastroenterol* 2013; 19: 7341–7360. DOI: 10.3748/wjg.v19.i42.7341. PMID: 24259965
 32. Mooberry M.J., Key N.S. Microparticle analysis in disorders of hemostasis and thrombosis. *Cytometry A*. 2016; 89 (2): 111–122. DOI: 10.1002/cyto.a.22647. PMID: 25704723
 33. Morel O., Jesel L., Freyssinet J.M., Toti F. Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2011; 31 (1): 15–26. DOI: 10.1161/ATVBAHA.109.200956. PMID: 21160064
 34. Key N.S., Mackman N. Tissue factor and its measurement in whole blood, plasma, and microparticles. *Semin. Thromb. Hemost.* 2010; 36 (8): 865–875. DOI: 10.1055/s-0030-1267040. PMID: 21049387
 35. Owens A.P. 3rd, Mackman N. Microparticles in hemostasis and thrombosis. *Circ Res.* 2011; 108 (10): 1284–1297. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.110.233056. PMID: 21566224
 36. Horstman L.L., Jy W., Jimenez J.J., Bidot C., Ahn Y.S. New horizons in the analysis of circulating cell-derived microparticles. *Keio J. Med.* 2004; 53 (4): 210–230. PMID: 15647627
 37. Sinauridze E.I., Kireev D.A., Popenko N.Y., Pichugin A.V., Pantelev M.A., Krymskaya O.V., Ataullakhanov F.I. Platelet microparticle membranes have 50- to 100-fold higher specific procoagulant activity than activated platelets. *Thromb. Haemost.* 2007; 97 (3): 425–434. PMID: 17334510
 38. Northup P.G., Caldwell S.H. Coagulation in liver disease: a guide for the clinician. *Clin Gastroenterol. Hepatol.* 2013; 11 (9): 1064–1074. PMID: 23506859
 39. Harrison M.F. The Misunderstood Coagulopathy of Liver Disease: A Review for the Acute Setting. *West J. Emerg Med.* 2018; 19 (5): 863–871. DOI: 10.5811/westjem.2018.7.37893. PMID: 30202500
 40. Witters P., Freson K., Verslype C., Peerlinck K., Hoylaerts M., Nevens F., Van Geet C., Cassiman D. Review article: blood platelet number and function in chronic liver disease and cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2008; 27 (11): 1017–1029. DOI: 10.1111/j.1365-2036.2008.03674.x. PMID: 18331464
 - gregation. Focus on spontaneous aggregation. *Vestnik VGMU*. 2013; 3: 79–91. [In Russ.]
 17. Gores G.J., Wiesner R.H., Dickson E.R., Zinsmeister A.R., Jorgensen R.A., Langworthy A. Prospective evaluation of esophageal varices in primary biliary cirrhosis: development, natural history and influence on survival. *Gastroenterology* 1989; 96: 1552–1559. DOI: 10.1016/0016-5085 (89)90526-X. PMID: 2785470
 18. Biagini M.R., Guardascione M., McCormick A.P., Raskino C., McIntyre N., Burroughs A.K. Bleeding varices in PBC and its prognostic significance. *Gut* 1990; 31: A1209. DOI: 10.1016/0168-8278 (90)91361-Y
 19. Yang L., Rezaie A.R. Calcium-binding sites of the thrombin-thrombomodulin-protein C complex: possible implications for the effect of platelet factor 4 on the activation of vitamin K-dependent coagulation factors. *Thromb Haemost.* 2007; 97 (6): 899–906. PMID: 17549291
 20. Agarwal S., Joyner K.A. Jr, Swaim M.W. Ascites fluid as a possible origin for hyperfibrinolysis in advanced liver disease. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 3218–3224. DOI: 10.1111/j.1572-0241.2000.03299.x. PMID: 11095345
 21. Ben-Ari Z., Panagou M., Patch D., Bates S., Osman E., Pasi J., Burroughs A. Hypercoagulability in patients with primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis evaluated by thrombelastography. *J Hepatol* 1997; 26: 554–559. DOI: 10.1016/S0168-8278 (97)80420-5. PMID: 9075662
 22. Pihusch R., Rank A., Göhring P., Pihusch M., Hiller E., Beuers U. Platelet function rather than plasmatic coagulation explains hypercoagulable state in cholestatic liver disease. *J. Hepatol* 2002; 37: 548–555. DOI: 10.1016/S0168-8278 (02)00239-8. PMID: 12399218
 23. Sullivan B.P., Weinreb P.H., Violette S.M., Luyendyk J.P. The coagulation system contributes to alphaVbeta6-integrin expression and liver fibrosis induced by cholestasis. *Am. J. Pathol* 2010; 177: 2837–2849. DOI: 10.2353/ajpath.2010.100425. PMID: 21037076
 24. Joshi N., Kopec A.K., O'Brien K.M., Towery K.L., Cline-Fedewa H., Williams K.J., Copple B.L., Flick M.J., Luyendyk J.P. Coagulation-driven platelet activation reduces cholestatic liver injury and fibrosis in mice. *J. Thromb. Haemost.* 2015; 13: 57–71. DOI: 10.1111/jth.12770. PMID: 25353084
 25. Hartmann M., Szalai C., Saner F.H. Hemostasis in liver transplantation: Pathophysiology, monitoring, and treatment. *World J. Gastroenterol.* 2016; 22 (4): 1541–1550. DOI: 10.3748/wjg.v22.i4.1541. PMID: 26819521
 26. Krzanicki D., Sugavanam A., Mallett S. Intraoperative hypercoagulability during liver transplantation as demonstrated by thromboelastography. *Liver Transpl.* 2013; 19 (8): 852–861. DOI: 10.1002/lt.23668. PMID: 23696318
 27. Francis J.L., Armstrong D.J. Fibrinogen-bound sialic acid levels in the dysfibrinogenemia of liver disease. *Haemostasis* 1982; 11: 215–222. DOI: 10.1159/000214666. PMID: 6290353
 28. Dumitrescu G., Januszkiewicz A., Ågren A., Magnusson M., Wahlin S., Wernerman J. Thrombelastometry: relation to the severity of liver cirrhosis in patients considered for liver transplantation. *Medicine (Baltimore)* 2017; 96: e7101. DOI: 10.1097/MD.00000000000007101. PMID: 28591054
 29. Shaydakov M.E., Blebea J. Thromboelastography (TEG). StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019. PMID: 30725746
 30. Mannucci P.M., Vigano S. Deficiencies of protein C, an inhibitor of blood coagulation. *Lancet* 1982; 2: 463–467. DOI: 10.1016/S0140-6736 (82)90494-9. PMID: 6125639
 31. Reshetnyak V.I. Physiological and molecular biochemical mechanisms of bile formation. *World J Gastroenterol* 2013; 19: 7341–7360. DOI: 10.3748/wjg.v19.i42.7341. PMID: 24259965
 32. Mooberry M.J., Key N.S. Microparticle analysis in disorders of hemostasis and thrombosis. *Cytometry A*. 2016; 89 (2): 111–122. DOI: 10.1002/cyto.a.22647. PMID: 25704723
 33. Morel O., Jesel L., Freyssinet J.M., Toti F. Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2011; 31 (1): 15–26. DOI: 10.1161/ATVBAHA.109.200956. PMID: 21160064
 34. Key N.S., Mackman N. Tissue factor and its measurement in whole blood, plasma, and microparticles. *Semin. Thromb. Hemost.* 2010; 36 (8): 865–875. DOI: 10.1055/s-0030-1267040. PMID: 21049387
 35. Owens A.P. 3rd, Mackman N. Microparticles in hemostasis and thrombosis. *Circ Res.* 2011; 108 (10): 1284–1297. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.110.233056. PMID: 21566224
 36. Horstman L.L., Jy W., Jimenez J.J., Bidot C., Ahn Y.S. New horizons in the analysis of circulating cell-derived microparticles. *Keio J. Med.* 2004; 53 (4): 210–230. PMID: 15647627
 37. Sinauridze E.I., Kireev D.A., Popenko N.Y., Pichugin A.V., Pantelev M.A., Krymskaya O.V., Ataullakhanov F.I. Platelet microparticle membranes have 50- to 100-fold higher specific procoagulant activity than activated platelets. *Thromb. Haemost.* 2007; 97 (3): 425–434. PMID: 17334510
 38. Northup P.G., Caldwell S.H. Coagulation in liver disease: a guide for the clinician. *Clin Gastroenterol. Hepatol.* 2013; 11 (9): 1064–1074. PMID: 23506859
 39. Harrison M.F. The Misunderstood Coagulopathy of Liver Disease: A Review for the Acute Setting. *West J. Emerg Med.* 2018; 19 (5): 863–871. DOI: 10.5811/westjem.2018.7.37893. PMID: 30202500
 40. Witters P., Freson K., Verslype C., Peerlinck K., Hoylaerts M., Nevens F., Van Geet C., Cassiman D. Review article: blood platelet number and function in chronic liver disease and cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2008; 27 (11): 1017–1029. DOI: 10.1111/j.1365-2036.2008.03674.x. PMID: 18331464

41. Carbone M., Neuberger J. Liver transplantation in PBC and PSC: indications and disease recurrence. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2011; 35: 446–454. DOI: 10.1016/j.clinre.2011.02.007. PMID: 21459072
42. Pena Polanco N.A., Levy C., Martin E.F. Cholestatic liver diseases after liver transplant. *Clin Liver Dis* 2017; 21: 403–420. DOI: 10.1016/j.cld.2016.12.011. PMID: 28364821
43. Martin E.F., Levy C. Timing, management, and outcomes of liver transplantation in primary sclerosing cholangitis. *Semin. Liver Dis.* 2017; 37: 305–313. DOI: 10.1055/s-0037-1608655. PMID: 29272893
44. She W.H., Chan A.C.Y., Cheung T.T., Lo C.M., Chok K.S.H. Survival outcomes of liver transplantation for hepatocellular carcinoma in patients with normal, high and very high preoperative alpha-feto-protein levels. *World J. Hepatol.* 2018; 10 (2): 308–318. DOI: 10.4254/wjh.v10.i2.308. PMID: 29527266
45. Carbone M., Neuberger J.M. Autoimmune liver disease, autoimmunity and liver transplantation. *J. Hepatol.* 2014; 60 (1): 210–223. DOI: 10.1016/j.jhep.2013.09.020. PMID: 24084655
46. Cruz-Ramón V., Chinchilla-López P., Ramírez-Pérez O., Méndez-Sánchez N. Effects of portal vein thrombosis on the outcomes of liver cirrhosis: a Mexican perspective. *J. Transl Int Med* 2017; 5: 189–191. DOI: 10.1515/jtjm-2017-0031. PMID: 29340273
47. Trebicka J., Strassburg C.P. Etiology and complications of portal vein thrombosis. *Viszeralmedizin* 2014; 30: 375–380. DOI: 10.1159/000369987. PMID: 26288604
48. Primignani M., La Mura V. Diagnosis of thrombophilia/prothrombotic conditions in patients with liver disease. *Clin Liver Dis* 2014; 6: 126–128. DOI: 10.1002/cld.342
49. Saugel B., Lee M., Feichtinger S., Hapfelmeier A., Schmid R.M., Siveke J.T. Thrombophilic factor analysis in cirrhotic patients with portal vein thrombosis. *J. Thromb. Thrombolysis* 2015; 40: 54–60. DOI: 10.1007/s11239-014-1124-z. PMID: 25115839
50. Amitrano L., Brancaccio V., Guardascione M.A., Margaglione M., Iannaccone L., D'Andrea G., Marmo R., Ames P.R., Balzano A. Inherited coagulation disorders in cirrhotic patients with portal vein thrombosis. *Hepatology* 2000; 31: 345–348. DOI: 10.1002/hep.510310213. PMID: 10655256
51. Dentali F., Galli M., Gianni M., Ageno W. Inherited thrombophilic abnormalities and risk of portal vein thrombosis. A meta-analysis. *Thromb. Haemost* 2008; 99: 675–682. DOI: 10.1160/TH07-08-0526. PMID: 18392325
52. Muciño-Bermejo J., Carrillo-Esper R., Uribe M., Méndez-Sánchez N. Coagulation abnormalities in the cirrhotic patient. *Ann. Hepatol* 2013; 12: 713–724. PMID: 24018489
53. Tripodi A., Primignani M., Lemma L., Chantarangkul V., Mannucci P.M. Evidence that low protein C contributes to the procoagulant imbalance in cirrhosis. *J. Hepatol* 2013; 59: 265–270. DOI: 10.1016/j.jhep.2013.03.036. PMID: 23583273
54. Manzano-Robledo Mdel C., Barranco-Fragoso B., Uribe M., Méndez-Sánchez N. Portal vein thrombosis: what is new? *Ann. Hepatol* 2015; 14: 20–27. PMID: 25536638
55. Решетняк Т.М., Щербакова М.Ю., Жданова Л.В., Насонов Е.Л. Антифосфолипидный синдром, антифосфолипидные антитела и генетические тромбофилии у детей с соматической патологией. *Научно-практическая ревматология*. 2008; 4: 48–57.
56. Bezemer I.D., van der Meer F.J., Eikenboom J.C., Rosendaal F.R., Doggen C.J. The value of family history as a risk indicator for venous thrombosis. *Arch. Intern. Med.* 2009; 169: 610–615. DOI: 10.1001/archinternmed.2008.589. PMID: 19307525
57. Постнов А.Ю., Гончарова Л.Н., Хасанова З.Б., Бирлюкова Д.В., Козовалова Н.В., Тимошкина Е.И., Семенова С.В., Снеговской В.А., Кузовенкова О.Н. Изучение генетических маркеров тромбоза у лиц с артериальной гипертензией титульного населения республики мордовия. *Архив патологии*. 2009; 71 (4): 34–36.
58. Решетняк Т.М. Антифосфолипидный синдром: диагностика и клинические проявления (лекция) *Научно-практическая ревматология*. 2014; 52 (1): 56–71. DOI: 10.14412/1995-4484-2014-56-71
59. Shafia S., Zargar M.H., Khan N., Ahmad R., Shah Z.A., Asimi R. High prevalence of factor V Leiden and prothrombin G20101A mutations in Kashmiri patients with venous thromboembolism. *Gene* 2018; 654: 1–9. DOI: 10.1016/j.gene.2018.02.031. PMID: 29454086
60. Ferro D., Quintarelli C., Lattuada A., Leo R., Alessandroni M., Mannucci P.M., Violi F. High plasma levels of von Willebrand factor as a marker of endothelial perturbation in cirrhosis: relationship to endotoxemia. *Hepatology* 1996; 23: 1377–1383. DOI: 10.1002/hep.510230613. PMID: 8675154
61. Tripodi A., Anstee Q.M., Sogaard K.K., Primignani M., Valla D.C. Hypercoagulability in cirrhosis: causes and consequences. *J. Thromb. Haemost.* 2011; 9: 1713–1723. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2011.04429.x. PMID: 21729237
62. Miyakis S., Lockshin M.D., Atsumi T., Branch D.W., Brey R.L., Cervera R., Derksen R.H., DE Groot P.G., Koike T., Meroni P.L., Reber G., Shoenfeld Y., Tincani A., Vlachoyiannopoulos P.G., Krilis S.A. International consensus statement on an update of the preliminary classification criteria for antiphospholipid syndrome (APS). *J. Thromb. Haemost.* 2006; 4: 295–306. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2006.01753.x. PMID: 16420554
63. Насонов Е.Л. Антифосфолипидный синдром. М.: Литтера, 2004: 440. ISBN: 5-98216-010-5
64. Erkan D., Pierangeli S.S., editors. Antiphospholipid syndrome: insights and highlights from the 13th International Congress on Anti-
41. Carbone M., Neuberger J. Liver transplantation in PBC and PSC: indications and disease recurrence. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2011; 35: 446–454. DOI: 10.1016/j.clinre.2011.02.007. PMID: 21459072
42. Pena Polanco N.A., Levy C., Martin E.F. Cholestatic liver diseases after liver transplant. *Clin Liver Dis* 2017; 21: 403–420. DOI: 10.1016/j.cld.2016.12.011. PMID: 28364821
43. Martin E.F., Levy C. Timing, management, and outcomes of liver transplantation in primary sclerosing cholangitis. *Semin. Liver Dis.* 2017; 37: 305–313. DOI: 10.1055/s-0037-1608655. PMID: 29272893
44. She W.H., Chan A.C.Y., Cheung T.T., Lo C.M., Chok K.S.H. Survival outcomes of liver transplantation for hepatocellular carcinoma in patients with normal, high and very high preoperative alpha-feto-protein levels. *World J. Hepatol.* 2018; 10 (2): 308–318. DOI: 10.4254/wjh.v10.i2.308. PMID: 29527266
45. Carbone M., Neuberger J.M. Autoimmune liver disease, autoimmunity and liver transplantation. *J. Hepatol.* 2014; 60 (1): 210–223. DOI: 10.1016/j.jhep.2013.09.020. PMID: 24084655
46. Cruz-Ramón V., Chinchilla-López P., Ramírez-Pérez O., Méndez-Sánchez N. Effects of portal vein thrombosis on the outcomes of liver cirrhosis: a Mexican perspective. *J. Transl Int Med* 2017; 5: 189–191. DOI: 10.1515/jtjm-2017-0031. PMID: 29340273
47. Trebicka J., Strassburg C.P. Etiology and complications of portal vein thrombosis. *Viszeralmedizin* 2014; 30: 375–380. DOI: 10.1159/000369987. PMID: 26288604
48. Primignani M., La Mura V. Diagnosis of thrombophilia/prothrombotic conditions in patients with liver disease. *Clin Liver Dis* 2014; 6: 126–128. DOI: 10.1002/cld.342
49. Saugel B., Lee M., Feichtinger S., Hapfelmeier A., Schmid R.M., Siveke J.T. Thrombophilic factor analysis in cirrhotic patients with portal vein thrombosis. *J. Thromb. Thrombolysis* 2015; 40: 54–60. DOI: 10.1007/s11239-014-1124-z. PMID: 25115839
50. Amitrano L., Brancaccio V., Guardascione M.A., Margaglione M., Iannaccone L., D'Andrea G., Marmo R., Ames P.R., Balzano A. Inherited coagulation disorders in cirrhotic patients with portal vein thrombosis. *Hepatology* 2000; 31: 345–348. DOI: 10.1002/hep.510310213. PMID: 10655256
51. Dentali F., Galli M., Gianni M., Ageno W. Inherited thrombophilic abnormalities and risk of portal vein thrombosis. A meta-analysis. *Thromb. Haemost* 2008; 99: 675–682. DOI: 10.1160/TH07-08-0526. PMID: 18392325
52. Muciño-Bermejo J., Carrillo-Esper R., Uribe M., Méndez-Sánchez N. Coagulation abnormalities in the cirrhotic patient. *Ann. Hepatol* 2013; 12: 713–724. PMID: 24018489
53. Tripodi A., Primignani M., Lemma L., Chantarangkul V., Mannucci P.M. Evidence that low protein C contributes to the procoagulant imbalance in cirrhosis. *J. Hepatol* 2013; 59: 265–270. DOI: 10.1016/j.jhep.2013.03.036. PMID: 23583273
54. Manzano-Robledo Mdel C., Barranco-Fragoso B., Uribe M., Méndez-Sánchez N. Portal vein thrombosis: what is new? *Ann. Hepatol* 2015; 14: 20–27. PMID: 25536638
55. Решетняк Т.М., Щербакова М.Ю., Жданова Л.В., Насонов Е.Л. Антифосфолипидный синдром, антифосфолипидные антитела и генетические тромбофилии у детей с соматической патологией. *Научно-практическая ревматология*. 2008; 4: 48–57. [In Russ.]
56. Bezemer I.D., van der Meer F.J., Eikenboom J.C., Rosendaal F.R., Doggen C.J. The value of family history as a risk indicator for venous thrombosis. *Arch. Intern. Med.* 2009; 169: 610–615. DOI: 10.1001/archinternmed.2008.589. PMID: 19307525
57. Postnov A.Yu., Goncharova L.N., Hasanova Z.B., Biryukova D.V., Kozovalova N.V., Timoshkina E.I., Semenova S.V., Snegovskoy V.A., Kuzovkova O.N. The study of genetic markers of thrombosis in individuals with arterial hypertension in the titular population of the Republic of Mordovia. *Arkhiv patologii*. 2009; 71 (4): 34–36 [In Russ.]
58. Решетняк Т.М. Антифосфолипидный синдром: diagnosis and clinical manifestations (lecture) *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya*. 2014; 52 (1): 56–71. [In Russ.] DOI: 10.14412/1995-4484-2014-56-71
59. Shafia S., Zargar M.H., Khan N., Ahmad R., Shah Z.A., Asimi R. High prevalence of factor V Leiden and prothrombin G20101A mutations in Kashmiri patients with venous thromboembolism. *Gene* 2018; 654: 1–9. DOI: 10.1016/j.gene.2018.02.031. PMID: 29454086
60. Ferro D., Quintarelli C., Lattuada A., Leo R., Alessandroni M., Mannucci P.M., Violi F. High plasma levels of von Willebrand factor as a marker of endothelial perturbation in cirrhosis: relationship to endotoxemia. *Hepatology* 1996; 23: 1377–1383. DOI: 10.1002/hep.510230613. PMID: 8675154
61. Tripodi A., Anstee Q.M., Sogaard K.K., Primignani M., Valla D.C. Hypercoagulability in cirrhosis: causes and consequences. *J. Thromb. Haemost.* 2011; 9: 1713–1723. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2011.04429.x. PMID: 21729237
62. Miyakis S., Lockshin M.D., Atsumi T., Branch D.W., Brey R.L., Cervera R., Derksen R.H., DE Groot P.G., Koike T., Meroni P.L., Reber G., Shoenfeld Y., Tincani A., Vlachoyiannopoulos P.G., Krilis S.A. International consensus statement on an update of the preliminary classification criteria for antiphospholipid syndrome (APS). *J. Thromb. Haemost.* 2006; 4: 295–306. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2006.01753.x. PMID: 16420554
63. Nasonov E.L. Antiphospholipid syndrome. M.: Littera, 2004: 440. [In Russ.] ISBN: 5-98216-010-5
64. Erkan D., Pierangeli S.S., editors. Antiphospholipid syndrome: insights and highlights from the 13th International Congress on Anti-

- ti-phospholipid Antibodies. New York: Springer Science+Business Media, 2012: 23–113. ISBN: 9781461431947
65. Asherson R.A., Cervera R., Piette J.-Ch., Shoenfeld Y., editors. The antiphospholipid syndrome II: autoimmune thrombosis. New York: Elsevier, 2002: 478. ISBN: 9780080527307
 66. Решетняк Т.М., Вапилова Т.В. Клинико-лабораторные критерии диагностики антифосфолипидного синдрома — что важно знать практическому врачу (лекция). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2010; 11: 13–20.
 67. Решетняк Т.М. Глава 13. Антифосфолипидный синдром. 377–406. В кн. Бадюкин В.В., ред. Ревматология. Клинические лекции. М.: Литтер, 2012: 592. ISBN: 978-5-4235-0062-7.
 68. Willis R., Pierangeli S.S. Pathophysiology of the antiphospholipid antibody syndrome. *Auto Immun. Highlights* 2011; 2: 35–52. DOI: 10.1007/s13317-011-0017-9. PMID: 26000118
 69. Willis R., Gonzalez E.B., Brasier A.R. The journey of antiphospholipid antibodies from cellular activation to antiphospholipid syndrome. *Curr. Rheumatol Rep* 2015; 17: 16. DOI: 10.1007/s11926-014-0485-9. PMID: 25761923
 70. Cervera R., Piette J.C., Font J., Khamashta M.A., Shoenfeld Y., Camps M.T., Jacobsen S., Lakos G., Tincani A., Kontopoulou-Griva I., Galeazzi M., Meroni P.L., Derksen R.H., de Groot P.G., Gromnica-Ihle E., Baleva M., Mosca M., Bombardieri S., Houssiau F., Gris J.C., Quéré I., Hachulla E., Vasconcelos C., Roch B., Fernández-Nebro A., Boffa M.C., Hughes G.R., Ingelmo M.; Euro-Phospholipid Project Group. Antiphospholipid syndrome: clinical and immunologic manifestations and patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. *Arthritis Rheum*. 2002; 46: 1019–1027. DOI: 10.1002/art.10187. PMID: 11953980
 71. Mackworth-Young C.G., Melia W.M., Harris E.N., Gharavi A.E., Sivathondan Y., Derue G., Sherlock S., Hughes G.R. The Budd-Chiari syndrome. Possible pathogenic role of anti-phospholipid antibodies. *J. Hepatol*. 1986; 3: 83–86. DOI: 10.1016/S0168-8278(86)80150-7. PMID: 3091679
 72. Uthman I., Khamashta M. The abdominal manifestations of the antiphospholipid syndrome. *Rheumatology (Oxford)* 2007; 46: 1641–1647. DOI: 10.1093/rheumatology/kem158. PMID: 17636180
 73. Reshetnyak T.M., Seredavkina N.V., Satybaldyeva M.A., Nasonov E.L., Reshetnyak V.I. Liver transplantation in a patient with primary antiphospholipid syndrome and Budd-Chiari syndrome. *World J. Hepatol*. 2015; 7: 2229–2236. DOI: 10.4254/wjh.v7.i19.2229. PMID: 26380049
 74. Hefaidh R., Cheikh M., Marsaoui L., Ennaifer R., Romdhane H., Ben Nejma H., Bel Hadj N., Arfa N., Khalfallah M.T. The Budd-Chiari syndrome. *Tunis Med* 2013; 91: 376–381. PMID: 23868034
 75. Goel R.M., Johnston E.L., Patel K.V., Wong T. Budd-Chiari syndrome: investigation, treatment and outcomes. *Postgrad Med J* 2015; 91: 692–697. DOI: 10.1136/postgradmedj-2015-133402. PMID: 26494427
 76. Valla D.C. Budd-Chiari syndrome/hepatic venous outflow tract obstruction. *Hepatol Int* 2018; 12 Suppl 1: 168–180. DOI: 10.1007/s12072-017-9810-5. PMID: 28685257
 77. Aggarwal R., Ravishankar B., Misra R., Aggarwal A., Dwivedi S., Naik S.R. Significance of elevated IgG anticardiolipin antibody levels in patients with Budd-Chiari syndrome. *Am. J. Gastroenterol*. 1998; 93: 954–957. DOI: 10.1111/j.1572-0241.1998.00286.x. PMID: 9647027
 78. Espinosa G., Font J., Garcia-Pagan J.C., Tassies D., Reverter J.C., Gaig C., Cervantes F., Cervera R., Bosch J., Ingelmo M. Budd-Chiari syndrome secondary to antiphospholipid syndrome: clinical and immunologic characteristics of 43 patients. *Medicine (Baltimore)* 2001; 80: 345–354. DOI: 10.1097/00005792-200111000-00001. PMID: 11704712
 79. Mansueto A. Budd-Chiari syndrome management: lights and shadows. *World J. Hepatol*. 2011; 3: 262–264. DOI: 10.4254/wjh.v3.i10.262. PMID: 22059108
 80. Bhattacharyya M., Makharia G., Kannan M., Ahmed R.P., Gupta P.K., Saxena R. Inherited prothrombotic defects in Budd-Chiari syndrome and portal vein thrombosis: a study from North India. *Am. J. Clin. Pathol*. 2004; 121: 844–847. DOI: 10.1309/F2U1-XBV4-RXYU-AYG0. PMID: 15198356
 81. Remkova A. Diagnostic approach to hypercoagulable states. *Bratisl Lek Listy* 2006; 107: 292–295. PMID: 17125064
 82. Lian E.C., Tzakis A.G., Andrews D. Response of factor V inhibitor to rituximab in a patient who received liver transplantation for primary biliary cirrhosis. *Am J Hematol* 2004; 77: 363–365. DOI: 10.1002/ajh.20181. PMID: 15551286
 83. Lisman T., Caldwell S.H., Burroughs A.K., Northup P.G., Senzolo M., Stravitz R.T., Tripodi A., Trotter J.F., Valla D.C., Porte R.J. Coagulation in Liver Disease Study Group. Hemostasis and thrombosis in patients with liver disease: the ups and downs. *J Hepatol* 2010; 53: 362–371. DOI: 10.1016/j.jhep.2010.01.042. PMID: 20546962
 84. Lisman T., Porte R.J. Rebalanced hemostasis in patients with liver disease: evidence and clinical consequences. *Blood* 2010; 116: 878–885. DOI: 10.1182/blood-2010-02-261891. PMID: 20400681
 85. Решетняк В.И., Журавель С.В., Кузнецова Н.К., Писарев В.М., Клычникова Е.В., Сюткин В.Е., Решетняк Т.М. Система гемостаза в норме и при трансплантации печени (обзор). *Общая реаниматология*. 2018; 14 (5): 58–84. DOI: 10.15360/1813-9779-2018-5-58-84
 - phospholipid Antibodies. New York: Springer Science+Business Media, 2012: 23–113. ISBN: 9781461431947
 65. Asherson R.A., Cervera R., Piette J.-Ch., Shoenfeld Y., editors. The antiphospholipid syndrome II: autoimmune thrombosis. New York: Elsevier, 2002: 478. ISBN: 9780080527307
 66. Reshetnyak T.M., Vavilova T.V. Clinical and laboratory criteria for the diagnosis of antiphospholipid syndrome — what is important for a practical doctor to know (lecture). *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. [in Russ.] 2010; 11: 13–20.
 67. Reshetnyak T.M. Chapter 13. Antiphospholipid syndrome. 377–406. In the book. Badokin V.V., ed. Rheumatology. Clinical lectures. M.: Litter, 2012: 592. [In Russ.] ISBN: 978-5-4235-0062-7.
 68. Willis R., Pierangeli S.S. Pathophysiology of the antiphospholipid antibody syndrome. *Auto Immun. Highlights* 2011; 2: 35–52. DOI: 10.1007/s13317-011-0017-9. PMID: 26000118
 69. Willis R., Gonzalez E.B., Brasier A.R. The journey of antiphospholipid antibodies from cellular activation to antiphospholipid syndrome. *Curr. Rheumatol Rep* 2015; 17: 16. DOI: 10.1007/s11926-014-0485-9. PMID: 25761923
 70. Cervera R., Piette J.C., Font J., Khamashta M.A., Shoenfeld Y., Camps M.T., Jacobsen S., Lakos G., Tincani A., Kontopoulou-Griva I., Galeazzi M., Meroni P.L., Derksen R.H., de Groot P.G., Gromnica-Ihle E., Baleva M., Mosca M., Bombardieri S., Houssiau F., Gris J.C., Quéré I., Hachulla E., Vasconcelos C., Roch B., Fernández-Nebro A., Boffa M.C., Hughes G.R., Ingelmo M.; Euro-Phospholipid Project Group. Antiphospholipid syndrome: clinical and immunologic manifestations and patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. *Arthritis Rheum*. 2002; 46: 1019–1027. DOI: 10.1002/art.10187. PMID: 11953980
 71. Mackworth-Young C.G., Melia W.M., Harris E.N., Gharavi A.E., Sivathondan Y., Derue G., Sherlock S., Hughes G.R. The Budd-Chiari syndrome. Possible pathogenic role of anti-phospholipid antibodies. *J. Hepatol*. 1986; 3: 83–86. DOI: 10.1016/S0168-8278(86)80150-7. PMID: 3091679
 72. Uthman I., Khamashta M. The abdominal manifestations of the antiphospholipid syndrome. *Rheumatology (Oxford)* 2007; 46: 1641–1647. DOI: 10.1093/rheumatology/kem158. PMID: 17636180
 73. Reshetnyak T.M., Seredavkina N.V., Satybaldyeva M.A., Nasonov E.L., Reshetnyak V.I. Liver transplantation in a patient with primary antiphospholipid syndrome and Budd-Chiari syndrome. *World J. Hepatol*. 2015; 7: 2229–2236. DOI: 10.4254/wjh.v7.i19.2229. PMID: 26380049
 74. Hefaidh R., Cheikh M., Marsaoui L., Ennaifer R., Romdhane H., Ben Nejma H., Bel Hadj N., Arfa N., Khalfallah M.T. The Budd-Chiari syndrome. *Tunis Med* 2013; 91: 376–381. PMID: 23868034
 75. Goel R.M., Johnston E.L., Patel K.V., Wong T. Budd-Chiari syndrome: investigation, treatment and outcomes. *Postgrad Med J* 2015; 91: 692–697. DOI: 10.1136/postgradmedj-2015-133402. PMID: 26494427
 76. Valla D.C. Budd-Chiari syndrome/hepatic venous outflow tract obstruction. *Hepatol Int* 2018; 12 Suppl 1: 168–180. DOI: 10.1007/s12072-017-9810-5. PMID: 28685257
 77. Aggarwal R., Ravishankar B., Misra R., Aggarwal A., Dwivedi S., Naik S.R. Significance of elevated IgG anticardiolipin antibody levels in patients with Budd-Chiari syndrome. *Am. J. Gastroenterol*. 1998; 93: 954–957. DOI: 10.1111/j.1572-0241.1998.00286.x. PMID: 9647027
 78. Espinosa G., Font J., Garcia-Pagan J.C., Tassies D., Reverter J.C., Gaig C., Cervantes F., Cervera R., Bosch J., Ingelmo M. Budd-Chiari syndrome secondary to antiphospholipid syndrome: clinical and immunologic characteristics of 43 patients. *Medicine (Baltimore)* 2001; 80: 345–354. DOI: 10.1097/00005792-200111000-00001. PMID: 11704712
 79. Mansueto A. Budd-Chiari syndrome management: lights and shadows. *World J. Hepatol*. 2011; 3: 262–264. DOI: 10.4254/wjh.v3.i10.262. PMID: 22059108
 80. Bhattacharyya M., Makharia G., Kannan M., Ahmed R.P., Gupta P.K., Saxena R. Inherited prothrombotic defects in Budd-Chiari syndrome and portal vein thrombosis: a study from North India. *Am. J. Clin. Pathol*. 2004; 121: 844–847. DOI: 10.1309/F2U1-XBV4-RXYU-AYG0. PMID: 15198356
 81. Remkova A. Diagnostic approach to hypercoagulable states. *Bratisl Lek Listy* 2006; 107: 292–295. PMID: 17125064
 82. Lian E.C., Tzakis A.G., Andrews D. Response of factor V inhibitor to rituximab in a patient who received liver transplantation for primary biliary cirrhosis. *Am J Hematol* 2004; 77: 363–365. DOI: 10.1002/ajh.20181. PMID: 15551286
 83. Lisman T., Caldwell S.H., Burroughs A.K., Northup P.G., Senzolo M., Stravitz R.T., Tripodi A., Trotter J.F., Valla D.C., Porte R.J. Coagulation in Liver Disease Study Group. Hemostasis and thrombosis in patients with liver disease: the ups and downs. *J Hepatol* 2010; 53: 362–371. DOI: 10.1016/j.jhep.2010.01.042. PMID: 20546962
 84. Lisman T., Porte R.J. Rebalanced hemostasis in patients with liver disease: evidence and clinical consequences. *Blood* 2010; 116: 878–885. DOI: 10.1182/blood-2010-02-261891. PMID: 20400681
 85. Reshetnyak V.I., Zhuravel S.V., Kuznetsova N.K., Pisarev V.M., Klychnikova E.V., Syutkin V.E., Reshetnyak T.M. The System of Blood Coagulation in Normal and in Liver Transplantation (Review). *Obshchaya Reanimatologiya=General Reanimatology*. 2018; 14 (5): 58–84. [In Russ.] DOI: 10.15360/1813-9779-2018-5-58-84

Поступила 16.04.19

Received 16.04.19

Механизмы нейропротекции при церебральной гипотермии (обзор)О. А. Шевелев^{1,2}, М. В. Петрова^{1,2}, Ш. Х. Саидов¹, Н. А. Ходорович², П. Прадхан^{2*}¹ Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии,
Россия, 141534, Московская область, Солнечногорский район, д. Лыткино, д. 777² Российский университет дружбы народов,
Россия, 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

* Непал

Neuroprotection Mechanisms in Cerebral Hypothermia (Review)Oleg A. Shevelev^{1,2}, Marina V. Petrova^{1,2}, Shavkat Kh. Saidov¹,
Nadezhda A. Khodorovich², Pranil Pradkhan^{2*}¹ Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitology,
777 Lytkino 141534, Solnechnogorsk district, Moscow region, Russia² Peoples' Friendship University of Russia,
6 Miklukho-Maclaya Str., 117198 Moscow, Russia

* Nepal

Обзор посвящен рассмотрению нейропротекторных механизмов терапевтической гипотермии с позиций метаболической депрессии и реакций геномного перепрограммирования нейронов, развивающихся при понижении температуры головного мозга.

К объяснению эффектов влияния низких температур привлечена концепция гипотермического прекодиционирования, основанная на развитии типовых неспецифических реакций, обеспечивающих формирование цитопротекторного фенотипа нейронов при действии потенциально опасных раздражителей — ишемии, реперфузии и переохлаждения. Показана роль краниocereбральной гипотермии, как методики селективного гипотермического воздействия на головной мозг с целью нейропротекции и коррекции нарушений температурного баланса головного мозга.

Подход к терапевтической гипотермии как к гипотермическому прекодиционированию позволяет существенно расширить области ее применения и использовать в различных методических вариантах.

Ключевые слова: терапевтическая гипотермия; прекодиционирование; тепловой баланс; головной мозг

The review focuses on the neuroprotective mechanisms of therapeutic hypothermia from the standpoint of metabolic depression and genomic reprogramming of neurons that develop when brain temperature decreases.

The concept of hypothermic pre-conditioning based on the development of typical nonspecific reactions for the formation of the cytoprotective phenotype of neurons due to potentially dangerous stimuli, such as ischemia, reperfusion, and hypothermia, was used to explain the effects of low temperatures. The data confirming the role of therapeutic cerebral hypothermia as a technique of selective brain exposure to mild cold for the neuroprotection and correction of temperature balance disorders are shown.

The approach to therapeutic hypothermia as a hypothermic pre-conditioning allows to significantly expand the scope of its use in various procedural variants.

Keywords: therapeutic hypothermia; pre-conditioning; thermal balance; brain

DOI:10.15360/1813-9779-2019-6-94-114

Введение

Начиная с середины XX века механизмы терапевтической гипотермии (ТГ) традиционно рассматривают с позиций развития метаболической депрессии при понижении температуры тканей, влекущей за собой уменьшение

Introduction

Since the mid-twentieth century, the mechanisms of therapeutic hypothermia (TH) have been traditionally considered within the framework of metabolic depression due to the tissue temperature drop, leading to reduction of oxygen and substrate

Адресс для корреспонденции:Олег Алексеевич Шевелев
E-mail: shevelev_o@mail.ru**Correspondence to:**Oleg A. Shevelev
E-mail: shevelev_o@mail.ru

потребления кислорода и субстрата, повышение устойчивости тканей к ишемии и гипоксии [1, 2]. Позднее было показано, что в условиях гипотермии ограничивается синтез, высвобождение и взаимодействия сигнальных молекул, тормозятся воспалительный ответ, свободно-радикальные процессы и апоптоз [3]. Понижение температуры головного мозга приводит к угнетению практически всех известных механизмов эксайтотоксичности, а это способно обеспечить уменьшение объема вторичных повреждений нейронов при острой фокальной ишемии, внутримозговых кровоизлияниях и нейротравме.

Значительный нейропротективный потенциал ТГ, убедительно доказанный в экспериментах, побудил к широкому применению различных методов понижения температуры тела. Однако, в крупных клинических исследованиях не было обнаружено преимуществ общего охлаждения по сравнению со стандартной терапией у пациентов с инсультами и ЧМТ, а осложнения и побочные эффекты у них наблюдали гораздо чаще [4–6]. Очевидно, позитивные эффекты ТГ оказываются сбалансированы негативными последствиями общей гипотермии.

В этой связи целесообразно рассмотреть методику селективной гипотермии головного мозга в варианте краниocereбральной гипотермии (КЦГ). Показано, что охлаждение волосяной поверхности кожи головы способно понизить температуру коры больших полушарий при малозначимом понижении базальной температуры [7]. Тем не менее, в клинической практике превалируют методы индукции общего охлаждения.

В ряде опубликованных исследований эффективности применения КЦГ в составе стандартной терапии у пациентов с ишемическими церебральными катастрофами представлены данные, демонстрирующие существенное снижение летальности, развитие выраженного и стойкого регресса неврологического дефицита, повышение функционального результата терапии, по сравнению с группами пациентов, которым КЦГ не проводили [8–10]. Процедуры краниocereбрального охлаждения не сопровождались побочными эффектами и осложнениями, свойственными методикам общего охлаждения. Важно отметить, что применение непрерывной процедуры КЦГ длительностью 16–24 часа, позволяя снизить температуру коры больших полушарий до 30–32°C, не приводило к понижению базальной температуры менее 35–35,5°C.

В основе позитивных клинических результатов применения селективной церебральной гипотермии лежат известные, метаболически обусловленные, механизмы нейропротекции.

consumption and increase of tissue resistance to ischemia and hypoxia [1, 2]. Later, limited production, release, and interaction of signal molecules, as well as inhibition of inflammatory response, free radical processes, and apoptosis inhibition were shown to develop in hypothermia [3]. The decrease in brain temperature leads to the suppression of almost all known mechanisms of excitotoxicity, and this can provide a reduction in the extent of secondary damage to neurons in acute focal ischemia, intracerebral hemorrhage, and neurotrauma.

The significant neuroprotective potential of TH, which has been well established in experiments, has led to the widespread use of various ways to lower body temperature. However, no advantages of general cooling over standard therapy have been found in large clinical trials in patients with strokes and traumatic brain injury, and complications and side effects have been observed much more frequently [4–6]. Obviously, the positive effects of TH are balanced by the negative effects of general hypothermia.

In this regard, craniocerebral hypothermia (CCH), a variation of selective brain hypothermia, should be considered. Cooling of the scalp was shown to reduce the temperature of cerebral cortex while the decrease in basal temperature remained insignificant [7]. Nevertheless, the general cooling techniques are prevalent in clinical practice.

A number of published studies on the efficacy of CCH as a component of standard therapy in patients with ischemic cerebrovascular events have shown a substantial reduction in mortality, significant and persistent regression of neurological deficits, and an increase in the functional outcome of treatment compared to groups of patients who were not treated with CCH [8–10].

A number of published studies on the efficacy of CCH included in treatment of patients with ischemic cerebrovascular events have shown a substantial reduction in mortality, significant and persistent regression of neurological deficits, and an increase in the functional outcome of treatment compared to groups of patients who were not treated with CCH [8–10]. Craniocerebral cooling procedures were not associated with side effects and complications typical for the general cooling techniques. Importantly, the use of continuous CCH procedure lasting 16–24 hours and reducing the cortical temperature to 30–32°C did not result in a fall in basal temperature below 35–35.5°C.

Positive clinical results of selective cerebral hypothermia are based on well-known, metabolically determined mechanisms of neuroprotection. Apparently, absence of a significant decrease in body temperature, which requires control of muscular tremor and additional sedation, also seems to be important. In addition, the targeted cerebral hypothermia allows achieving a positive temperature

По-видимому, определенное значение имеет и факт того, что при КЦГ не развивается значимое понижение температуры тела, требующее контроля мышечной дрожи и дополнительной седации. Кроме того, таргетная церебральная гипотермия позволяет достичь положительного градиента температуры — температура головного мозга ниже температуры тела.

Однако, объяснения эффектов селективной гипотермии головного мозга не могут быть ограничены только метаболическим подходом. Показано, что при достижении температуры 28–32°C в нейронах, несмотря на сниженную температуру, инициируется энергичный синтез стресс-белков не смотря на сниженную температуру, продукция которых обусловлена экспрессией генов раннего реагирования [11]. Геномная перестройка обеспечивала формирование цитопротекторного фенотипа нейронов, повышая их устойчивость к действию свободных радикалов и эксайтотоксической стимуляции NMDA-рецепторов [12].

Определенная последовательность формирования состояния нейропротекции при охлаждении, включающая комплекс ранних и отсроченных реакций защиты, соответствует процессам, характерным для ишемического preconditionирования (ПК). Ишемическое ПК — явление повышения толерантности клеток различных органов к повреждающим воздействиям, развивающееся после предъявления серии «тренирующих» эпизодов ишемии и реперфузии [13]. В основе этого феномена также лежат ранняя метаболическая перестройка и отсроченная, генетически опосредованная устойчивость клеток к ишемии и реперфузии [14–17]. В этой связи закрепилось понятие о гипотермическом ПК [11, 18].

Краниocereбральное охлаждение, позволяя понизить температуру коры больших полушарий, оказывается эффективной методикой для купирования лихорадки, часто сопровождающей острый период повреждения головного мозга [19]. Существенно, что у 32% пациентов с инсультами и ЧМТ развивается скрыто протекающая церебральная гипертермия без выраженного подъема базальной температуры [20]. Повышение температуры тела и мозга существенно ухудшает тяжесть течения и исходы церебральных поражений [21]. В этих случаях КЦГ может способствовать нормализации теплового баланса головного мозга.

Рассмотрение КЦГ как средства коррекции церебральной гипертермии и лихорадки с позиций гипотермического ПК позволяет существенно расширить области применения КЦГ в различных методических вариантах не только в остром периоде развития поражений головного мозга.

gradient when the brain temperature is lower than the body temperature.

However, the selective hypothermia effects cannot be explained only through a metabolic approach. A vigorous synthesis of stress-proteins despite the reduced temperature was shown to be initiated when the temperature in neurons reached 28–32°C. This production was due to the expression of early response genes [11]. Genome rearrangement provided formation of cytoprotective neuronal phenotype, increasing their resistance to free radicals and excitotoxic stimulation of NMDA-receptors [12].

A specific pattern of neuroprotection development during cooling, including a series of early and delayed defense reactions, is consistent with the ischemic pre-conditioning (PC) processes. Ischemic PC is a phenomenon of increasing tolerance of cells of different organs to harmful effects, developing after exposure to a series of «training» episodes of ischemia and reperfusion [13]. This phenomenon is also based on early metabolic rearrangement and delayed and genetically mediated resistance of cells to ischemia and reperfusion [14–17]. In this regard, the concept of a hypothermic preconditioning was introduced [11, 18].

Cranio-cerebral cooling leading to a reduction in the cortical temperature is an effective way to terminate fever which is common for an acute brain injury [19]. Significantly, 32% of patients with strokes and traumatic brain injury develop latent cerebral hyperthermia without a distinct rise in basal temperature [20]. An increase in body and brain temperature significantly worsens the course and outcome of cerebral events [21]. In these cases, CCH can help to normalize the brain thermal balance.

A view of CCH as a way to correct the cerebral hyperthermia and fever within the framework of the hypothermic PC helps to significantly expand the scope of CCH use in various procedural variants beyond the acute period of cerebral injury.

The classical ischemic preconditioning. The concept of «pre-conditioning» is associated with the discovery of a fascinating type of organ and tissue adaptation to ischemia/reperfusion. This phenomenon develops due to the preventive subterminal training effects of recurrent ischemia/reperfusion episodes, which promote activation of standard nonspecific endogenous cytoprotection programs responsible for the formation of cytoprotective or cytotoxic phenotypes.

For the first time, the PC phenomenon was described as the increased tolerance of myocardium to ischemia developing after exposure to 3–5 short sequential episodes of interrupted and restored circulation (about 5 minutes of ischemia and 5–10 minutes of reperfusion). Subsequent repetitive terminal test ischemia lasting 40 minutes led to the development of a myocardial infarction with the

Классическое ишемическое ПК. Появление понятия «прекондиционирование» (*preconditioning* — подготовка, англ.) связано с открытием одной из интереснейших форм адаптации органов и тканей к ишемически/реперфузионным нагрузкам. В основе развития этого феномена лежит применение превентивных субтерминальных тренирующих воздействий эпизодами ишемии/реперфузии, обеспечивающих активацию типовых неспецифических эндогенных цитопротекторных программ, актуальная состоятельность которых определяет формирование цитопротекторного или цитодеструктивного фенотипа.

Впервые феномен ПК был описан, как эффект повышения толерантности сердца к ишемии, развивающийся после предъявления органу следующих друг за другом 3–5 кратковременных эпизодов прерывания и восстановления кровообращения (около 5 минут ишемии и 5–10 минут реперфузии). Последующее воспроизведение терминальной тестовой ишемии длительностью 40 минут приводило к формированию инфаркта миокарда, объем которого в зоне риска был значительно меньше по сравнению с таковым у животных контрольной группы, которые не подвергались процедуре ПК — 7,3 и 29,4% соответственно [13].

В экспериментах было обнаружено, что особенностью классического ишемического ПК является развитие органопротекторного эффекта сразу после предъявления тренировочных эпизодов ишемии/реперфузии, длящегося около 2-х часов, затем ослабевающего, но далее возобновляющегося на период 12–24 часа, с формированием таким образом раннего и позднего «окна» толерантности [22].

При однократном субтерминальном эпизоде ишемии развиваются реакции, характерные для обратимых повреждений клетки, включающие развитие ацидоза, снижение пула адениновых нуклеотидов и накопление креатинфосфата. Предъявление повторной ишемии после периода реперфузии изменяет характер клеточного ответа, сопровождается меньшим расходом АТФ и накоплением лактата [23].

Процесс формирования состояния ПК условно разделяют на три этапа: восприятие повреждающего стимула (триггерный этап), его внутриклеточную передачу (сигнальный этап) и собственно трансляцию к структурам реализации цитопротекции (эффекторный этап) [24].

В ответ на ишемическую стимуляцию накапливаются внутренние рецептор-зависимые триггеры (аденозин, опиоиды, норадреналин, брадикинин и др.) и рецептор-независимые триггеры (радикалы кислорода, ионы

much smaller volume in the risk zone compared with that in the control animals who did not undergo the PC procedure, i.e. 7.3% and 29.4%, respectively [13].

Experiments revealed that in a typical ischemic preconditioning the organoprotective effect occurs immediately after the exposure to training episodes of ischemia/reperfusion, and lasts about 2 hours, then fades, but resumes for a period of 12–24 hours, thus forming an early and late «window» of tolerance [22].

In a single subterminal episode of ischemia, responses typical of reversible cell damage develop, including acidosis, reduction of the adenine nucleotide pool and accumulation of creatine phosphate. Repeated exposure to ischemia after a reperfusion period alters the patterns of the cellular responses and is accompanied by lower ATP consumption and lactate accumulation [23].

Preconditioning develops in three conventional stages: the perception of the damaging stimulus (trigger stage), its intracellular transmission (signal stage), and the actual translation to the structures of cytoprotection implementation (effector stage) [24].

In response to ischemic stimulation, internal receptor-dependent triggers (adenosine, opioids, norepinephrine, bradykinin, etc.) and receptor-independent triggers (oxygen radicals, calcium ions, nitrogen oxide, etc.) accumulate [25, 26]. Triggers may also include external stimuli.

Next, the damage signal is transmitted to the cell targets with active participation of kinases (protein kinase C, tyrosine kinase, mitogen-activating protein kinase, reperfusion injury salvage kinases, etc.) [27–29]. Pre-conditioning develops following the activation of effectors, which primarily include potassium-dependent ATP channels of mitochondrial membranes [30]. The intracellular response cascade leads to deactivation of the mitochondrial pore, which, in most authors' opinion, lies at the heart of the cytoprotective effects of the early «window» of ischemic tolerance [31].

The employment of antioxidants during the multiple training ischemic cycles (superoxide dismutase, catalase) and A1 receptor antagonists prevented the development of preconditioning demonstrating significant impact of adenosine and reperfusion triggers in the myocardial preconditioning [32, 33].

Factors of intracellular signal transmission, in particular, free radicals and protein kinase C, which transfers the signal to the cell nucleus, seem to play a major role in the formation of the late tolerance «window». Signal transmission promotes the early response genes transcription and activates the synthesis of de novo effector stress proteins and antioxidant protection factors [34, 35]. Following the stabilization of mitochondrial membrane poten-

кальция, оксид азота и др.) [25, 26]. Триггеры могут быть и внешними.

Далее сигнал повреждения передается к клеточным мишеням при активном участии киназ (протеинкиназа C, тирозинкиназа, митоген-активирующая протеинкиназа, RISK — reperfusion injury salvage kinases и др.) [27–29]. Формирование состояния ПК развивается вслед за активацией эффекторов, в качестве которых, в первую очередь, рассматривают АТФ-зависимые калиевые каналы митохондриальных мембран [30]. Каскад внутриклеточных реакций, приводит к деактивации митохондриальной поры, что, по мнению большинства авторов, лежит в основе цитопротекторных эффектов раннего «окна» ишемической толерантности [31].

Роль аденозинового и реперфузионного триггеров в формировании ПК миокарда оказывается чрезвычайно важной, поскольку применение антиоксидантов в период воспроизведения тренирующих ишемических циклов (супероксиддисмутаза, каталаза) и антагонистов A1 рецепторов предотвращает развитие состояния ПК [32, 33].

В процессах формирования позднего «окна» толерантности основную роль, по-видимому, играют факторы внутриклеточной передачи сигнала, в частности — свободные радикалы и протеинкиназа C, которые передают сигнал к ядру клетки. Передача сигнала обеспечивает транскрипцию генов раннего реагирования и приводит к активации синтеза «*de novo*» эффекторных стресс-белков и факторов антиоксидантной защиты [34, 35]. Вслед за стабилизацией митохондриального мембранного потенциала, уменьшается высвобождение цитохрома C [36], блокируются сигнальные пути апоптоза и синтез каспаз, увеличивается синтез антиапоптотических белков класса Bcl, уменьшается экспрессия проапоптотического белка Bax [37, 38], подавляется транскрипция генов, активирующих цитодеструктивные процессы.

Одними из основных участников формирования цитопротекторного фенотипа клеток органа-мишени при ишемическом ПК являются стресс-белки. Увеличение синтеза белков теплового шока (БТШ, HSP — heat shock proteins) является универсальным неспецифическим ответом клетки на любое чрезвычайное воздействие, включая ишемию, реперфузию, перегревание и переохлаждение [39, 40].

Название «БТШ» весьма условно и связано с известным фактом случайного их открытия при нагревании мушки дрозофилы. Важно то, что этот класс наиболее консервативных и филогенетически древних белков обеспечивает универсальные типовые реакции защиты клетки любых организмов от самых разнообраз-

ных, cytochrome C release decreases [36], signaling pathways of apoptosis and caspase synthesis become blocked, the synthesis of antiapoptotic proteins of Bcl class increases, the expression of proapoptotic protein Bax decreases [37, 38], and the transcription of genes activating cell destruction is suppressed.

Stress proteins are among key participants in the formation of the cytoprotective phenotype of target organ cells in ischemic PC. Increased production of heat shock proteins (HSP) is a universal nonspecific response of a cell to any emergency effects, including ischemia, reperfusion, overheating, and hypothermia [39, 40].

The name of HSP is quite tentatively related to the fact of their accidental discovery when heating a drosophila fly. Importantly, this class of the most conservative and phylogenetically old proteins is responsible for universal typical cell protection reactions of any organism against various types of damage. The most important functions of HSP are control over the tertiary structure of proteins formation (folding/refolding), regeneration of damaged proteins or their degradation (renaturation/denaturation), and protein transport through intracellular membranes. The HSP class is very diverse, and their participation in organism reactions is fundamental [41, 42].

Within a few hours after PC initiation, the number of stress proteins in the cell may increase manifold, which ultimately provides effective cellular protection [43]. A direct correlation between the number of HSPs in cardiomyocytes and the level of myocardial ischemic tolerance was found [44]. The late «window» of PC initiates in parallel with the activation of the acute cellular protection phase. Protein-synthetic processes take time and fully develop within 12–24 hours, being the basis of delayed cell tolerance.

The ischemic PC phenomenon is typical not only for the heart, but also for other organs, including the brain [45], where it is observed as the reduced neuronal injury during the long-term test ischemia preceded by the training periods of ischemia/reperfusion [46].

The triggers of cerebral ischemic PC include both cardiomyocyte-specific inducers and excitotoxic cascade mediated reactions, triggered by the release of glutamate from neurons during ischemia and regulated by the GABA system [47].

Moderate stimulation of NMDA receptors with glutamate leads to adaptation of potential-dependent calcium channels and reduction of calcium overload during the test cerebral ischemia [48], and the use of NMDA receptor antagonists blocks the ischemic neuronal tolerance caused by a temporary decrease in the delivery of substrate and oxygen.

The neuroprotective effect of NMDA receptor activation by physiological levels of glutamate can

разных видов повреждения. Важнейшими функциями БТШ являются контроль корректного формирования третичной структуры белков (фолдинг/рефолдинг), восстановление поврежденных белков или их деградация (ренатурация/денатурация), транспорт белков через внутриклеточные мембраны. Класс БТШ весьма разнообразен, а их участие в реакциях организма фундаментально [41, 42].

В течение нескольких часов после инициации ПК количество стресс-белков в клетке может увеличиться многократно, что в итоге обеспечивает эффективную клеточную защиту [43]. Обнаружена прямая корреляция между количеством БТШ в кардиомиоцитах и степенью ишемической толерантности миокарда [44]. Позднее «окно» ПК начинает формироваться параллельно с активацией острой фазы клеточной защиты. Белковосинтетические процессы требуют времени и формируются в течении 12–24 часов, составляя основу отсроченной толерантности клеток.

Феномен ишемического ПК оказался характерен не только для сердца, но и для других органов, в том числе — для головного мозга [45], проявляя себя в уменьшении степени повреждения нейронов при предъявлении тестовой длительной ишемии, которой предшествовали тренирующие периоды ишемии/реперфузии [46].

Триггерные механизмы церебрального ишемического ПК включают как свойственные кардиомиоцитам иницирующие реакции, так и реакции, опосредованные каскадами эксайтотоксичности, запускаемые выбросом глутамата из нейронов во время ишемии и регулируемые при участии ГАМК-системы [47].

Умеренная стимуляция NMDA-рецепторов глутаматом приводит к адаптации потенциал-зависимых кальциевых каналов и уменьшению кальциевой перегрузки во время тестовой церебральной ишемии [48], а введение антагонистов NMDA-рецепторов блокирует формирование ишемической толерантности нейронов, вызванной временным снижением доставки субстрата и кислорода.

Нейропротективный эффект активации NMDA-рецепторов физиологическими концентрациями глутамата может быть опосредован высвобождением мозгового нейротрофического фактора и стимуляцией экспрессии целого ряда стресс-белков [49].

Показано, что гипоксическое ПК культур нейронов и астроцитов гиппокампа крысы сопровождается усилением поступления глюкозы внутрь клетки, а эффект толерантности может быть связан как с фактом обеспечения нейронов субстратом, так и с улучшением кальциевого гомеостаза [50]. ПК воздействие обеспечивает стабилизацию гематоэнцефали-

be mediated by the release of the brain neurotrophic factor and stimulated expression of several stress proteins [49].

The hypoxic PC of neuronal cultures and astrocytes of rat hippocampus was shown to associate with the increase in glucose entry into the cell, and the tolerance effect can be associated with both the availability of substrate for the neurons and the improvement of calcium homeostasis [50]. Preconditioning stabilizes the hemato-encephalic barrier and reduces brain edema in small rodents after terminal ischemia exposure [51].

Another effect of brain PC is the activation of synaptogenesis as a mechanism of nerve tissue regeneration after injury, including the growth of axonal branches and changes in the dendritic spines [52].

Ischemic PC reduces the expression of proinflammatory factors (IL-1, IL-6) after ischemia, as well as a number of genes involved in inflammation. Remarkably, the blockade of the proinflammatory component of responses developing in different types of PC and the activation of anti-inflammatory factors neutralize the effects of PC [53].

Reproduction of ischemic PC in the brain has specific features. For example, a series of ischemia/reperfusion episodes is required for the development of myocardial tolerance, whereas in the ischemic brain PC a single ischemic episode is more often used [54], because the exposure to repeated subterminal stimuli may lead to significant neuronal damage prior to the development of PC [55].

The cerebral ischemic tolerance was found to grow slowly for several hours, while a single sublethal stimulus produces a strong neuroprotective effect after 24–48 hours rather than immediately upon the test ischemia exposure, and it can persist for up to 7 days [56, 57].

This also suggests that an early PC «window» may only play a minor role in providing the basic ischemic tolerance of the brain, but is necessary for the late «window». However, there is evidence indicating relationship between intensity of the effect of training ischemia episodes and the dose of PC [58].

Preconditioning can be measured out by reducing or increasing the duration of ischemia and reperfusion periods and changing their amount in series. An important factor of efficacy for the training episodes of abnormal brain circulation is occlusion of a large caliber artery i. e. one or more cerebral arteries. However, it is not possible to identify the objective criteria of PC sufficiency, the acceptable limits of ischemia and reperfusion periods duration, especially since the cell actual condition due to ongoing injury can considerably modify them.

Sublethal intensity of exposure, mobilizing the emergency defense responses and creating the structural trace of adaptation, is a prerequisite for the development of the classic PC state. The well-known phrase of Friedrich Nietzsche: «What does

ческого барьера и уменьшение отека мозга у мелких грызунов после предъявления терминальной ишемии [51].

Еще одним эффектом ПК головного мозга является активация синаптогенеза, как механизма регенерации нервной ткани после повреждения, включая рост ветвей аксонов и изменения шипикового аппарата дендритов [52].

Ишемическое ПК уменьшает экспрессию провоспалительных факторов (IL-1, IL-6) в постишемическом периоде, а также ряда генов, участвующих в воспалении. Примечательно, что блокада провоспалительного компонента реакций, развивающегося при различных видах ПК, и активация противовоспалительных факторов нивелирует эффекты ПК воздействий [53].

Воспроизведение ишемического ПК в головном мозге имеет свои особенности. Так, для развития толерантности сердца требуется несколько серий эпизодов ишемии/реперфузии, тогда как при ишемическом ПК головного мозга чаще используется однократный ишемический эпизод [54], поскольку предъявление повторных субтерминальных стимулов может привести к выраженным повреждениям нейронов до развития состояния ПК [55].

Было обнаружено, что ишемическая толерантность головного мозга нарастает медленно в течение нескольких часов, а однократный сублетальный стимул обеспечивает развитие выраженного нейропротекторного эффекта при предъявлении тестовой ишемии не сразу, а через 24–48 часов, и он может сохраняться до 7 суток [56, 57].

Из этого также следует, что раннее «окно» ПК может не играть заметной роли в обеспечении базовой ишемической толерантности головного мозга, но необходимо для формирования позднего «окна». Впрочем, есть указания, что выраженность влияния эпизодов тренирующей ишемии зависит от дозы ПК воздействия [58].

Дозировать ПК воздействия можно уменьшая или увеличивая длительность периодов ишемии и реперфузии и определяя их число в серии. Важна глобальность тренирующих эпизодов нарушения кровообращения — окклюзия одной или нескольких мозговых артерий. Однако до настоящего времени не представляется возможным объективно определить критерии достаточности ПК воздействия, границы допустимых периодов ишемии и реперфузии, тем более что актуальное состояние клеток, в том числе в связи с уже произошедшим повреждением, может их существенно корректировать.

Обязательным условием развития состояния классического ПК является сублетальная

not kill me makes me stronger» fully conveys the main requirement of ischemic PC.

In other words, the consequences of training exposures can lead to both cell protection and cell destruction. This limits the clinical use of ischemic PC and prompts the search for safer ways to activate endogenous cytoprotection programs. Alternative methods of PC induction include remote, hypoxic, pharmacological and hypothermic PC. In relation to the issue under discussion, we will consider the specific features of a hypothermic PC.

Hypothermic PC. Tissue hypothermia is a well-known cause of blood flow depression, and this type of ischemia has no negative consequences within the specified limits of temperature drop [59]. The hypothermia reduces neuronal reactions to ischemia and extends their lifespan in low perfusion due to decreased demand. The release of the energizing amino acids and glutamate-mediated excitotoxicity, cellular respiration activity, and production of reactive oxygen species is decreasing; transmembrane permeability (including mitochondrial) is stabilized, and intracellular calcium overload becomes limited. Thus, the main trigger reactions of neuronal damage provoked by the ischemic cascade are blocked [60].

Hypothermia limits the local aseptic inflammation in brain ischemia and neurotrauma, reduces the release of proinflammatory factors, leukocyte migration and brain tissue infiltration, reduces edema, lowers the intracranial pressure, stabilizes the blood-brain barrier, and suppresses apoptosis cascades. Positive impact of low temperature on the development of pathogenetic reactions is shown both in the acute phase of ischemia and during the reperfusion.

The development of cytoprotective reactions immediately after reaching the therapeutic values of temperature reduction would apparently reproduce the effects of early «window» of tolerance. However, the resemblance of these effects of hypothermia with the emergency adaptation response in the classical PC appears to be only formal, because the decrease in the tissue temperature does not stimulate, but rather suppresses the main endogenous stages of PC development. The trigger stage is inhibited due to restricted free radical and NMDA-receptors stimulation processes, and reduced metabolism is accompanied by decrease in adenosine accumulation. When the temperature drops, the signaling stage is also inhibited due to reduced activity of enzymes, particularly kinases. In addition, the hypothermia contributes to the stabilization of mitochondrial membranes, thus completing the effector stage. This means imitation of the early endogenous mechanisms of PC but not their activation.

Notably, the therapeutic hypothermia in emergency conditions is used in the acute period

интенсивность воздействия, мобилизующая срочные реакции защиты и формирующая структурный след адаптации. Известное высказывание Ф. Ницше: «То, что нас не убивает, делает нас сильнее» очень полно передает основное содержание ишемического ПК.

Иначе говоря, последствия тренирующих воздействий могут приводить к развитию как цитопротекторных, так и цитодеструктивных процессов. В свою очередь это ограничивает клиническое применение ишемического ПК и побуждает поиск более безопасных способов активации эндогенных цитопротекторных программ. К альтернативным способам воспроизведения состояния ПК относятся удаленное (дистантное), гипоксическое, фармакологическое и гипотермическое ПК. Применительно к обсуждаемой проблеме, рассмотрим особенно-сти гипотермического ПК.

Гипотермическое ПК. Хорошо известно, что гипотермия тканей приводит к депрессии кровотока, причем такого рода ишемия не имеет негативных последствий в известных пределах понижения температуры [59]. Гипотермия способствует уменьшению реакций нейронов на ишемию, удлиняет период их жизни в условиях гипоперфузии в связи со снижением потребностей. Уменьшается выброс возбуждающих аминокислот и глутамат опосредованная эксайтотоксичность, активность клеточного дыхания и продукция свободных радикалов, стабилизируется трансмембранная проницаемость (включая митохондрии) ограничивается перегрузка внутриклеточным кальцием. Таким образом блокируются основные пусковые реакции повреждения нейронов, провоцируемые ишемическим каскадом [60].

Гипотермия ограничивает развитие местного асептического воспаления при ишемии мозга и нейротравме, обеспечивает снижение высвобождения провоспалительных факторов, миграции лейкоцитов и инфильтрации ими ткани мозга, уменьшает отек, понижает ВЧД и стабилизирует гематоэнцефалический барьер, подавляет каскады апоптоза. Позитивное влияние пониженной температуры на развитие патогенетических реакций показано как в острой фазе ишемии, так и в период реперфузии.

Развитие цитопротекторных реакций сразу после достижения терапевтических значений понижения температуры, казалось бы, воспроизводит эффекты раннего «окна» толерантности. Однако сходство данных эффектов гипотермии с реакциями экстренной адаптации при классическом ПК оказывается внешним, поскольку понижение температуры тканей не стимулирует, а скорее подавляет основные эндогенные этапы форми-

after severe vascular events, e. g. as a part of cardiopulmonary resuscitation, when the endogenous PC reactions have already been initiated, the spontaneous circulation has been restored, and the decrease in temperature leads to a safer terminal period of ischemia due to the working factors of ischemic PC initiation.

Apparently, the adequate balance of the metabolic cell protection intensity with temperature decrease and actual consistency of the functional endogenous cellular protection programs after the cerebrovascular accident and reperfusion is the main factor of prognosis for early period course.

Furthermore, the role of emergency response in the development of ischemic brain PC, in contrast to the heart, may prove to be insignificant and consist mainly in the initiation of genomic reprogramming of neurons, which results in basic long-term tolerance to ischemia/reperfusion. In this case, the hypothermia may reduce the negative consequences of acute terminal ischemia episode and, quite probably, maintain the state of late tolerance.

In particular, the animal experiments and studies with human cortical neuronal culture have shown that a decrease in temperature by 5–7°C, i. e., to 28–32°C, initiates the development of a sequence of delayed intracellular reactions, which are characteristic of the classical ischemic PC for neurons. Thus, a significant temperature signal triggers a drastic increase in the synthesis of different HSP molecules of distinct molecular masses (20–70 kDa). The activation of synthetic processes occurs with reduced temperature and affects mainly stress-proteins [61, 62].

In addition, under these conditions, the synthesis of cold shock proteins (CSP) is activated, their cellular level starts to increase in an hour, reaching a maximum after 24 hours and remains high for several days after a single temperature exposure lasting from 3–4 to 24 hours [11, 63]. The role of CSP in the hypothermic PC, in contrast to the classical PC, seems to be quite significant.

Cold shock proteins were discovered when studying the effect of low temperatures on plants and microorganisms. Later, they were found to be stress-protective proteins that protect cells from various adverse factors, not only cold, in animals and humans.

The most studied proteins of the CSP family are RNA-binding proteins RBM3 (RNA-Binding Proteins) and CIRBP (Cold Inducible RNA Binding Protein). They prevent the aggregation of matrix RNA, thus facilitating the process of protein synthesis, possess the properties of chaperone proteins, antioxidant properties and have a peculiar antifreeze effect on membranes [64].

The decrease in brain temperature to 32°C has also been shown to provoke the transcription of the c-fos early reaction gene, its content in neurons increasing threefold. Particularly noticeable increase

рования состояния ПК. Тормозится триггерный этап в связи с ограничением свободно-радикальных процессов и процессов стимуляции NMDA-рецепторов, а понижение метаболизма сопровождается уменьшением накопления аденозина. При понижении температуры, по-видимому, также тормозится сигнальный этап за счет снижения активности ферментов, в частности киназ. Кроме того, гипотермия способствует стабилизации состояния мембран митохондрий, тем самым завершая эффекторный этап. То есть, понижение температуры не активирует ранние эндогенные механизмы ПК, а скорее их имитирует.

Однако надо учитывать, что терапевтическую гипотермию в неотложных состояниях применяют в остром периоде после развития тяжелых сосудистых катастроф, например в составе СЛР, то есть тогда, когда запуск эндогенных реакций ПК уже произошел, спонтанное кровообращение восстановилось, а снижение температуры приводит последствия терминального периода ишемии к более безопасному течению на фоне сработавших факторов инициации ишемического ПК.

По-видимому, именно адекватное соотношение выраженности метаболически обусловленной цитопротекции при понижении температуры и актуальной состоятельности оперативных эндогенных программ клеточной защиты после острого нарушения кровообращения и реперфузии обеспечивают направленность развития последствий сосудистых катастроф в раннем периоде.

Кроме того, роль срочных реакций в развитии ишемического ПК головного мозга, в отличие от сердца, может оказаться невелика и заключаться в основном в запуске геномного перепрограммирования нейронов, последствия которого обеспечивают базовую длительную толерантность к ишемии/реперфузии. В этом случае гипотермия может уменьшить негативные последствия острого терминального эпизода ишемии и, вполне вероятно, поддерживать состояние поздней толерантности.

В частности, в экспериментах на животных и в исследованиях в культуре корковых нейронов человека показано, что снижение температуры на 5–7°C, то есть до 28–32°C, инициирует развитие последовательности отсроченных внутриклеточных реакций, которые оказываются свойственны классическому ишемическому ПК для нейронов. Так, значимый температурный сигнал обеспечивает в них лавинообразное увеличение синтеза БТШ с различной молекулярной массой (HSP 20–70 кДа). Причем активация синтетических процессов происходит на фоне сниженной температуры и касается практически только стресс-белков [61, 62].

in c-fos is observed after 24 hours of hypothermia. The RMB3 stress-protein production also increases manifold when the temperature drops to 32°C, remaining high after cooling. Equally interesting is the fact that the hypothermia leads to the activation of the c-jun early response gene, which provides a significant increase in the CIRBP synthesis, which is also most significant after 24 hours of hypothermia.

The participation of CIRBP in changing the balance of tau protein forms synthesis contributes to the restoration of the damaged microtubular system of the neuron, improvement of axonal transport, maintenance and restoration of cellular cytoskeleton. In addition, CIRBP is also involved in the refolding of pathological proteins, in particular beta-amyloid, which suggests a positive role of neuronal hypothermia not only in the formation of ischemic tolerance, but also in preventing the development of neurodegenerative processes.

The data on the role of tau-protein in the formation of neuronal tolerance appeared to be highly interesting. In experimental models of human cortical neuronal culture, the effect of reduced temperature (to 28°C and to 32°C) on phosphorylation-dephosphorylation of tau-protein and the associated effects of increasing neuronal resistance to damage were studied. Injury was modelled by stimulation of NMDA receptors and introduction of free radicals into the culture.

Tau phosphorylation was found to be reversibly activated at a temperature of 32°C, which was accompanied by a decrease in the extent of neuronal damage in excitotoxic and free-radical load. Dynamic transitions of the main key isoforms of tau-protein (phosphorylation-dephosphorylation) due to temperature decrease, in the authors' opinion, can promote synaptic plasticity and recovery of damaged neurons [64, 65]. The temperature reduction to 28°C did not affect the result in any fundamental way.

These facts confirm that the genomic reprogramming of neurons plays a key role in the development of the late tolerance effects of hypothermic PC, as well as in classical ischemic PC, contributing to the structural adaptation trace. On the other hand, we can assume potentiation of positive effects of both PC types.

As a result of increased stress proteins production, the cytoprotective phenotype develops which associates with the increase in the synthesis of stress proteins, which eventually makes it possible to reduce the extent of brain damage in cerebrovascular accidents.

Importantly, the launch of genomic reprogramming requires a significant decrease in the temperature of neurons up to 28–32°C. If we consider the cooling of incoming blood as the only way to reduce the cerebral temperature, we can clearly see that in order to achieve the required level of hypothermia it

Кроме того, в этих условиях активируется синтез белков холодового шока (БХШ, CSP — cold shock proteins), содержание которых в клетке начинает нарастать уже через час, достигая максимума через 24 часа и сохраняется на высоком уровне в течении нескольких суток при однократном температурном воздействии длительностью от 3–4 до 24 часов [11, 63]. Роль БХШ в гипотермическом ПК, в отличие от классического ПК кажется весьма значимой.

БХШ были открыты при изучении влияния низких температур на растения и микроорганизмы. Позднее было обнаружено, что они относятся к стресс-протекторным белкам и обеспечивают защиту клеток от действия различных неблагоприятных факторов, а не только холода, у животных и человека.

Наиболее изучены белки семейства БХШ, это РНК-связывающие белки RBM3 (RNA-Binding Proteins) и CIRBP (Cold Inducible RNA Binding Protein). Они препятствуют агрегации матричной РНК, облегчая тем самым процесс синтеза белка, обладают свойствами белков-шаперонов, антиоксидантными свойствами и своеобразным антифризным действием на мембраны [64].

Показано также, что понижение температуры мозга до 32°C провоцирует транскрипцию гена раннего реагирования *c-fos*, содержание которого в нейронах трехкратно нарастает. Особенно выраженное увеличение *c-fos* наблюдается спустя 24 часа гипотермии. При этом, синтез стресс-белков RBM3 также увеличивается многократно при снижении температуры до 32°C, оставаясь на высоком уровне после охлаждения. Не менее интересно и то, что гипотермия приводит к активации гена раннего реагирования *c-jun*, обеспечивающего значительное нарастание синтеза CIRBP, что также наиболее заметно через 24 часа индукции гипотермии.

Участие CIRBP в изменении соотношения синтеза форм *tau*-протеина способствует восстановлению поврежденной микротубулярной системы нейрона, улучшению аксонального транспорта, сохранению и восстановлению цитоскелета клетки. Кроме того, CIRBP участвует в рефолдинге патологических белков, в частности бета-амилоида, из чего можно предположить позитивную роль гипотермии нейронов не только в формировании ишемической толерантности, но и в предупреждении развития нейродегенеративных процессов.

Весьма интересными оказались данные о роли *tau*-протеина в формировании толерантности нейронов. В экспериментальных моделях культуры кортикальных нейронов человека исследовали влияние сниженной до 28°C и 32°C температуры на процессы фосфорилирова-

is necessary to reduce the basal temperature to a dangerous level, invariably leading to complications, neutralizing the desired positive results.

Taking into account the clinical risks of reaching the critical body temperature necessary for initiation of cellular mechanisms of endogenous protection, the attempts to model fragments of the late hypothermic PC development with the use of drugs affecting *tau*-protein phosphorylation have been made. As a result of imitation, we can obtain the processes typical for cooling of neurons and boosting their resistance to hypoxia and conclude: «One can reap the benefits of cooling — without cooling the patient!» (Rzechorzek N. M., 2015).

This approach is typical for the pharmacological PC techniques where the early and delayed ischemic tolerance is reproduced by imitation of endogenous mechanisms but not by their real initiation.

Several studies reveal the mechanisms of delayed cellular resistance to hypoxia/reperfusion and show the persistence of the hypothermic effects over a long period after cooling has stopped []. In this sense, the above statement seems to be extremely important and accurate.

The high risks of general hypothermia complications should be eliminated, but an adequate level of brain hypothermia should be achieved at the same time. The use of selective cerebral hypothermia in the CCH variant appears to be the most adequate in this respect, making it possible to lower the temperature of neurons, at least in the cortex, to the specified limits without a significant decrease in basal temperature.

Selective hypothermia of the hemispheric cortex. Brain is the main target of hypothermia in cerebral damage. Considering CCH as a technique of predominant hypothermia of the hemispheric cortex, we should determine what mechanisms and to what extent the scalp cooling can lower the temperature of the brain.

Convection provided by powerful central flow of arterial blood (about 20% of the minute blood volume) is usually considered as the main way to remove excess heat from the brain. Heat removal is also associated with heat exchange in the anatomical junctions of jugular veins (carrying externally cooled blood) with internal carotid arteries (countercurrent heat exchange), which makes the normal resting temperature of blood in the internal carotid artery approximately 0.2°C lower than in the aorta [66–68]. As a result, the cooling of the scalp can reduce the temperature of the outgoing blood, which may lower the temperature of the inflowing blood after entering the jugular vein system. Under normal hospital conditions, the temperature of the blood flowing from the scalp is not lower than 34°C. With CCH, scalp temperatures of 8–10°C and lower can be achieved, which can increase the efficiency of heat exchange.

ния/дефосфорилирования tau-протеина и связанные с ними эффекты повышения устойчивости нейронов к повреждению. Повреждение моделировали стимуляцией NMDA-рецепторов и введением в культуру свободных радикалов.

Оказалось, что при температуре культуры 32°C обратимо активируется tau-фосфорилирование, что сопровождается уменьшением объема повреждения нейронов в условиях эксайтотоксической и свободно-радикальной нагрузки. Динамичные переходы основных ключевых изоформ tau-протеина (фосфорилирование/дефосфорилирование) под влиянием снижения температуры, по мнению авторов, могут способствовать развитию синаптической пластичности и восстановлению поврежденных нейронов [64, 65]. Понижение температуры до 28°C принципиально не влияло на результат.

Указанные факты свидетельствуют о том, что геномное перепрограммирование нейронов играет ключевую роль в формировании эффектов поздней толерантности гипотермического ПК, так же, как и при классическом ишемическом ПК, обеспечивая формирование структурного следа адаптации. В свою очередь можно допустить наличие потенциации позитивных эффектов обоих видов ПК.

Именно с нарастанием синтеза стресс-белков связывают формирование цитопротекторного фенотипа, что в итоге формирует условия, приводящие к уменьшению объема повреждения мозга при острых нарушениях кровообращения.

Важно отметить, что запуск геномного перепрограммирования требует значительно понижения температуры нейронов — до 28–32°C. Если рассматривать в качестве единственного способа понижения церебральной температуры охлаждения притекающей крови, становится ясно, что для достижения необходимого уровня гипотермии требуется понижение базальной температуры до опасного уровня, неизбежно влекущего за собой развитие осложнений, нивелирующих искомые позитивные результаты.

Учитывая клинические риски достижения критической температуры тела, необходимой для инициации клеточных механизмов эндогенной защиты, выполнены попытки моделирования фрагментов формирования позднего гипотермического ПК с использованием препаратов, влияющих на фосфорилирование tau-протеина. Получение в результате имитации процессов, развивающихся при охлаждении нейронов и повышающих их устойчивость к гипоксии, позволило сделать вывод: «Пожинать плоды гипотермии можно без гипотермии!» (Rzechorzek N. M., 2015).

Cold blood flowing from the scalp through the emissary veins and the parietal bone perforations enters the dural sinuses and, through pial vessels, directly reaches the surface of the hemispheric cortex, lowering its temperature [69]. When cooling the scalp surface, the blood flow in the skin is maintained but reduced to 35% of the baseline [70], creating a way for convection cooling of the hemispheric cortex.

Cooling the cranial region can produce a significant temperature difference between the skin and brain surface of about 25°C. Despite the low thermal conductivity of soft tissues and flat bones of the skull, the resulting temperature gradient can provide a significant outward heat flow from the hemispheric cortex through conduction.

The analytical approach to the problem of heat transfer in the targeted hypothermia of the brain induced by the cooling of the craniocerebral region has demonstrated that the values of the external scalp temperature during cooling significantly affect the temperature distribution in the surface area of the cerebral cortex, causing its decrease. The estimated results were confirmed by experiments on rats [71]. Cooling of the scalp has been shown to have less effect on the temperature of the base of the brain than on the surface area.

The pattern of temperature distribution in the human brain was studied using MRI, which made it possible to build a 3D model of the brain thermal profile based on the NMR spectroscopy data. Using this approach, the researchers revealed that when the temperature of the scalp decreases, hypothermia of the cerebral cortex develops without significant changes in the temperature of subcortical structures [70].

There have been a lot of theoretical publications on the construction of a thermal brain model. In particular [72], when modeling brain cooling and the thermodynamic temperature distribution using the solution of the heat conductivity equation for living systems, the modeling of 4-hour cooling of the scalp at a temperature of 0–10°C was shown to reduce the temperature of the surface brain regions to 33.2°C to a depth of 25 mm. Estimates took into account the characteristics of cold impact on the scalp and thermal properties of tissues that make up the path of heat conduction (soft tissues of the scalp surface, flat bones of the skull, brain membranes). The estimated data very accurately match the model of brain thermal balance in craniocerebral hypothermia, presented in another study [74].

Thus, the experimental results, NMR spectroscopy modeling and estimates of thermodynamic temperature distribution inside the brain demonstrate the possibility of lowering the cortical temperature during craniocerebral cooling. However, experimental and computational models do not take into account all possible pathways of heat

Данный подход характерен для развития методик фармакологического ПК, при которых раннюю и отсроченную ишемическую толерантность воспроизводят за счет имитации, но не воспроизведения эндогенных механизмов.

В ряде работ раскрыты механизмы формирования отсроченной устойчивости клеток к гипоксии/реперфузии и показано сохранение эффектов гипотермического воздействия на длительный период после прекращения охлаждения [11, 12, 15–17, 56]. В этом смысле приведенное высказывание кажется чрезвычайно важным и точным.

Необходимо преодолеть высокие риски осложнений общей гипотермии, но обеспечить достаточный уровень гипотермии мозга. В этом смысле применение селективной церебральной гипотермии в варианте КЦГ оказывается наиболее адекватным, позволяя понизить температуру нейронов, по крайней мере коры больших полушарий, до указанных пределов без значимого понижения базальной температуры.

Селективная гипотермия коры больших полушарий. Основной мишенью гипотермического воздействия при церебральных поражениях является головной мозг. Рассматривая КЦГ, как методику преимущественной гипотермии коры больших полушарий, необходимо определить благодаря каким механизмам и в какой степени охлаждение волосистой поверхности кожи головы способно понизить температуру головного мозга.

В качестве основного пути удаления избытка теплоты от головного мозга в норме обычно рассматривают конвекцию, обеспеченную мощными центральными потоками артериальной крови (около 20% МОК). Теплоотведение связано также с обменом теплоты в области анатомических контактов сосудов системы яремных вен, несущих охлажденную во внешней среде кровь, с внутренними сонными артериями (противоточный теплообмен), благодаря чему температура крови во внутренней сонной артерии в норме в покое примерно на 0,2°C ниже, чем в аорте [66–68]. Из этого следует, что охлаждение кожи головы способно привести к понижению температуры отекающей крови, которая, попадая в систему яремных вен, может способствовать понижению температуры притекающей к мозгу крови. В обычных условиях стационара температура отекающей от кожи головы крови оказывается не ниже 34°C. При КЦГ может быть достигнута температуры кожи головы 8–10°C и ниже, что способно усилить эффективность теплообмена.

Надо также учесть, что холодная кровь от кожи головы по эмиссарным венам через перфорантные отверстия теменных костей проникает в синусы твердой мозговой оболочки и пиальные сосуды непосредственно к поверх-

removal and may not fully reflect the real picture of the influence of CCH on the brain thermal homeostasis. To solve this problem, the technique of non-invasive microwave radiothermometry can be used.

This technique consists in measuring the power of human deep tissues' own electromagnetic radiation (EMR) registered in the microwave range (wavelength 3–60 cm, frequency 109–1010 Hz), which makes it possible to measure the temperature at the depth up to several centimeters from the skin surface [75].

Any physical body with a temperature above absolute zero (-273 °K) is known to be a source of EMR in a wide range of frequencies, and in the radio range the intensity of radiation is directly proportional to the temperature of a biological object. In the medical literature [76], the terms «radio-brightness» and «internal» temperature of biological tissues, which corresponds to the true thermodynamic temperature, are the most common.

The obtained temperature values are estimates taking into account the dielectric tissue properties, the depth of EMR tissue attenuation, and other parameters. The penetration depth of radiation in biological objects depends on its frequency. In particular, the depth of internal tissue temperature measurement in the centimeter range of about 3 GHz is about 5–7 centimeters from the surface [77]. At the same time, measurements are made by placing an antenna of a specific area on the skin surface.

The measurement of the power of deep tissue EMR allows obtaining the average temperature values in a sufficiently large volume, depending on the diameter of antenna and spreading of radiation.

Thus, the contact antenna of about 30 mm in diameter can register deep tissue EMR in the volume up to 1500–1800 mm³, and the estimated temperature values in this case will correspond to the average temperature in the whole volume for a predetermined period of time required for measurement.

The recorded radio-brightness (internal) temperature values are affected by the initial skin temperature and the ambient temperature. In this regard, modern devices for non-invasive registration of internal temperatures usually contain a dual-band antenna that can register EMR in the infrared (skin temperature) and microwave (internal temperature) ranges.

Computerized measuring devices (microwave radiothermometers), such as RTM-01-RES (Russia), provide an automated calculation of radio-brightness temperature based on the numerical solution of the Maxwell equation.

The measurement procedure itself is quite simple. The antenna is installed by pressing it firmly against the skin surface in the target tissue or organ projection. Within 3–5 seconds the measurement is

ности коры больших полушарий, понижая ее температуру [69]. При охлаждении поверхности скальпа кровотоки в коже сохраняются, но понижается до 35% от исходного [70], формируя путь конвекционного охлаждения коры больших полушарий.

Следует также учитывать, что охлаждение краниальной области головы способно сформировать значительную разность температур между кожей и поверхностью мозга, которая составит около 25°C. Несмотря на низкую теплопроводность мягких тканей и плоских костей черепа, создаваемый температурный градиент способен обеспечить значительный поток теплоты от коры больших полушарий наружу путем кондукции.

При аналитическом решении задачи передачи теплоты при целевой гипотермии головного мозга, индуцируемой охлаждением краниоцеребральной области было показано, что значения наружной температуры кожи головы при ее охлаждении существенно влияют на распределение температуры в поверхностной зоне коры головного мозга, обеспечивая ее понижение. Полученные расчетные данные были подтверждены экспериментами на крысах [71]. Показано, что охлаждение кожи головы не так сильно влияет на температуру основания мозга, как на поверхностную зону.

Характер распределения температуры в головном мозге человека исследовали с применением МРТ, что позволило на основе данных ЯМР-спектроскопии сформировать 3Д-модель тепловой картины в объеме мозга. При такого рода подходах было выявлено, что при понижении температуры кожи головы формируется гипотермия коры головного мозга без значимых изменений температуры подкорковых структур [70].

Теоретических работ, посвященных построению тепловой модели головного мозга выполнено достаточно много. В частности, [72] при моделировании процесса охлаждения мозга и распределения термодинамической температуры с помощью решения уравнения теплопроводности для живых систем было показано, что моделирование 4-х часового охлаждения кожи головы при температуре 0–10°C способно понизить температуру поверхностных областей головного мозга до 33,2°C на глубину до 25 мм. В расчетах учитывали особенности холодового воздействия на кожу головы и тепловые свойства тканей, составляющих путь теплопроводения (мягкие ткани поверхности головы, плоские кости черепа, оболочки мозга). Эти расчетные данные очень точно совпадают с моделью теплового баланса головного мозга при краниоцеребральной гипотермии, приведенные в другой работе [74].

performed and the data are received in °C, averaged with due regard to the measurement duration.

It is essential to change the position of the antenna sequentially, making measurements in specified areas, getting a pattern of distribution of the organ's internal temperature in the volume of the measurement depth resolution.

The technique [78] of measuring the brain temperature has been developed, with the antenna successively moving along the surface of the scalp and being installed in the standard symmetric projection areas of the left and right hemispheres. This helps assess the pattern of temperature field distribution in the hemispheric cortex over the entire surface of the brain. The depth of deep tissue EMR localization averages 5–7 cm from the skin surface, so the technique only allows estimating the temperature of the cortical surface of hemispheres.

Despite the sufficient body of publications confirming the correct use of microwave radiothermometry for estimating brain temperature [85], it is appropriate to refer to the study [7], which validated the measurement technique in experiments on animals (rabbits) and in clinical trials.

Induction temperature sensors were implanted into the brains of experimental animals and the registered parameters were compared with the results of microwave radiothermometry.

In the clinical section of the study, the brain temperature values recorded with the temperature sensors (Pressio®, Sophysa) implanted into the brain parenchyma of neurosurgical patients to a depth of 6–7 cm were compared with the data obtained in microwave radiothermometry.

Based on the comparison of brain temperature values recorded by different methods (number of measurements: rabbits $n=100$, patients $n=200$), a satisfactory data agreement was obtained: in animals $\pm 0.23^\circ\text{C}$, in neurosurgical patients $\pm 0.52^\circ\text{C}$ [8].

Discrepancies in the temperature measurement of the implanted temperature sensor are quite objective, since the brain tissue volume in contact with the active part of the sensor does not exceed 10–20 mm³, whereas microwave radiothermometry covers the tissue volume up to 1800 mm³ and records the values of the average temperature in the whole volume. At the same time, the representativity of the results is confirmed by repeated measurements done at different times and by different researchers. In microwave radiothermometry, a good agreement of results was found in repeated measurements.

A study of the hemispheric cortical temperature in healthy individuals ($n=120$) using microwave radiothermometry [7] showed that by the 4th hour of cooling, the use of CCH to stabilize the scalp temperature at about 8–10°C provided a reliable reduction in the average temperature of the left hemisphere from $36.74 \pm 0.37^\circ\text{C}$ to $32.9 \pm 0.26^\circ\text{C}$,

Таким образом, результаты экспериментальных исследований, моделирование на основе ЯМР-спектроскопии и расчет распределения термодинамической температуры внутри головного мозга демонстрируют возможности понижения температуры коры больших полушарий при краниocereбральном охлаждении. Однако, экспериментальные и расчетные модели не учитывают все возможные пути отведения теплоты и могут не в полной мере отражать реальную картину влияния КЦГ на тепловой гомеостаз головного мозга. Для решения этой задачи может быть использована методика неинвазивной СВЧ-радиотермометрии.

Существо методики состоит в измерении мощности собственного электромагнитного излучения (ЭМИ) глубоких тканей человека, зарегистрированного в микроволновом диапазоне ($\lambda=3-60$ см, частота 109–1010 Гц), что позволяет определить температуру на глубине нескольких сантиметров от поверхности кожи [75].

Известно, что любое физическое тело с температурой выше абсолютного нуля (-273°K), является источником ЭМИ в широком диапазоне частот, причем в радиодиапазоне интенсивность излучения прямо пропорциональна температуре биологического объекта. В медицинской литературе [76] наибольшее распространение получили термины «радиояркость» и «внутренняя» температура биологических тканей, которая совпадает с истинной термодинамической температурой.

Получаемые значения температуры являются расчетными и учитывают диэлектрические параметры тканей, глубину затухания в них ЭМИ и др. параметры. Глубина проникновения излучения в биологических объектах зависит от его частоты. В частности, глубина измерения температуры внутренних тканей в сантиметровом диапазоне около 3 ГГц достигает 5–7 сантиметров от поверхности [77]. При этом, измерения проводят, размещая антенну определенной площади на поверхности кожи.

Необходимо иметь в виду, что измерения мощности собственного ЭМИ глубоких тканей обеспечивают получение значений средней температуры в достаточно большом объеме, что зависит от диаметра антенны и особенностей распространения излучения.

В частности, контактная антенна диаметром около 30 мм позволяет регистрировать ЭМИ глубоких тканей в объеме, достигающем 1500–1800 мм³, а расчетные значения температуры в этом случае будут соответствовать усредненной температуре во всем объеме, причем за определенный период времени, необходимый для измерения.

На зарегистрированные значения радиояркости (внутренней) температуры влияет исходная температура кожи, температура

and of the right hemisphere from $36.64\pm0.32^\circ\text{C}$ to $32.95\pm0.26^\circ\text{C}$. At the same time, the axial temperature did not change. Notably, these results coincide quite accurately with the estimates obtained in the previous paper [72].

The same authors have shown that in patients in the first day of ischemic stroke ($n=121$) the average temperature of the left hemisphere was $37.11\pm0.1^\circ\text{C}$, and the average temperature of the right hemisphere was $37.14\pm0.1^\circ\text{C}$. After a 16-hour session of CCH, the temperature of the left hemisphere decreased to $32.64\pm0.54^\circ\text{C}$, the temperature of the right hemisphere decreased to $33.01\pm0.45^\circ\text{C}$, and after 24 hours of cooling the temperature of the left hemisphere reached $31.05\pm0.4^\circ\text{C}$, and the temperature of the right hemisphere reached $30.41\pm0.2^\circ\text{C}$. Basal temperature remained within the range of $36-35.5^\circ\text{C}$, and such a mild general hypothermia was not accompanied by muscular tremor and did not require additional pharmacological correction.

The fact of the decrease in the cortical hemispheric temperature caused by CCH without significant changes in basal temperature was also confirmed in another study, which included non-invasive microwave brain radiothermometry in healthy individuals and patients with ischemic stroke [9].

In addition, in neurosurgical patients ($n=3$) with severe traumatic brain injury after decompressive trepanation and restoration of bone defect, the brain temperature was measured with temperature sensors implanted into the brain parenchyma at a depth of 6–7 cm (Pressio®, Sophysa) [7]. Craniocerebral hypothermia was found to cause a rapid decrease in brain temperature by $3-5^\circ\text{C}$.

These data demonstrate that CCH can effectively reduce the brain surface temperature and, with sufficient duration, help to achieve the temperature values initiating the hypothermic PC.

Using microwave radiothermometry, the areas of elevated temperature up to $38-41^\circ\text{C}$ were detected in the first and second days of the focal cerebral ischemia, regardless of the localization of the lesion site. These areas coincided with the primary focus projections in 85% of cases. The average temperature of the hemispheric cortex was $0.5-0.7^\circ\text{C}$ higher than in healthy individuals. This means that in acute ischemia almost all patients developed cerebral hypothermia. In 32% of cases, it was latent, without raising the basal temperature. Craniocerebral hypothermia reduced the average temperature of the brain cortex, including in hyperthermic foci, and normalized the body temperature in patients with fever, emphasizing the cerebroprotective capabilities of CCH [80].

The increase in neuronal temperature during the acute period of brain damage is caused by the development of almost all stages of the ischemic cascade in the area of penumbra [81]. Thus, the glu-

внешней среды. В этой связи современные устройства для неинвазивной регистрации внутренних температур обычно содержат двухдиапазонную антенну, позволяющую регистрировать ЭМИ в ИК (температура кожи) и СВЧ (внутренние температуры) диапазонах.

В компьютеризированных устройствах измерения (СВЧ-радиотермометры), например РТМ-01-РЭС (РФ), предусмотрен автоматизированный расчет радиояркостной температуры, основанный на численном решении уравнения Максвелла.

Сама по себе процедура измерения достаточно проста. Устанавливают антенну, плотно прижимая ее к поверхности кожи в проекции ткани или органа, температуру которых требуется измерить. В течение 3–5 сек проводят измерение и получают данные в °C, усредненные с учетом определенной длительности измерения.

Весьма существенно, что положение антенны можно последовательно менять, проводя измерения в определенных областях, получая картину распределения внутренней температуры органа в объеме разрешающей глубины измерения.

Разработана методика [78] измерения температуры головного мозга, при которой антенну последовательно перемещают по поверхности волосистой части головы и устанавливают в стандартных симметричных областях проекций левого и правого полушарий, что позволяет оценить особенности распределения температурных полей коры больших полушарий по всей поверхности головного мозга. Учитывая, что глубина локации ЭМИ глубоких тканей составляет в среднем 5–7 см от поверхности кожи, методика позволяет оценить только температуру поверхности коры больших полушарий.

Несмотря на достаточный объем публикаций, подтверждающий корректное использование СВЧ-радиотермометрии для оценки температуры головного мозга [85], уместно сослаться на исследование [7], в котором была проведена валидация методики измерения в экспериментах на животных (кролики) и при клинических исследованиях.

В мозг экспериментальных животных имплантировали индукционные термодатчики и сравнивали зарегистрированные показатели с результатами СВЧ-радиотермометрии.

В клиническом разделе исследования проводили сравнение значений температуры мозга, зарегистрированных с использованием термодатчиков (Pressio®, Sophysa), имплантированных в паренхиму мозга на глубину до 6–7 см у нейрохирургических пациентов, с данными, полученными при СВЧ-радиотермометрии.

На основании сопоставления значений температуры мозга, зарегистрированных раз-

тама «hit» and the resulting neuronal excitation is inevitably accompanied by an increase in metabolism, i. e. a focal temperature increase. Cellular respiration disorders with the activation of free radical processes lead to an increase in non-enzymatic oxidation, i. e. to the activation of ineffective metabolism, resulting in an increase in temperature [82]. Inflammation leads to a metabolic «fire» and a temperature increase. At the same time, hyperthermia has an independent damaging effect on neurons, causing their additional excitation, increasing excitotoxicity reactions, activating proinflammatory processes and completing pathogenetic vicious circles [83].

Obviously, more research is needed to obtain a complete picture of the effects of CCH on the thermal processes in the brain. At the same time, the presented data and obtained positive clinical effects of the technique in patients with acute cerebral accidents suggest its preference over general cooling.

Firstly, in brain damage, edema develops, intracranial pressure increases, and cerebral perfusion decreases. As a result, the central delivery of chilled blood to penumbra (which is the only way of brain hypothermia in general cooling) is difficult. In the case of CCH, heat removal is accomplished both by convection and conduction (two heat removal paths), which seems to be preferable.

Secondly, in contrast to general hypothermia, CCH offers very «mild» lowering of basal temperature, can be done to patients with different levels of consciousness, does not require additional sedation and muscular tremor control, reduces the pharmacological burden on the patient. The typical complications and side-effects of general hypothermia capable of neutralizing the positive effects of cooling do not develop in CCH.

Third, basic therapy involves the use of numerous drugs with various types of action, which can interfere with the endogenous mechanisms of PC. Ketamine, barbiturates, propofol, beta-blockers, calcium channel blockers inhibit the PC effects. Antioxidant and anti-inflammatory drugs, hypoglycemic drugs and hyperglycemia have the same effect [84–88].

Obviously, the above-mentioned list of factors hampering the positive effects of hypothermia is incomplete. Nevertheless, it is reasonable to assume that the lack of evidence for the effectiveness of general hypothermia in stroke and traumatic brain injury is largely related to them. Hypothetically, a certain «conflict» between general and cerebral hypothermia can be suggested to develop in focal brain lesions due to an unreasonable decrease in the temperature of internal organs.

This suggests that the induction of selective cerebral hypothermia of sufficient depth along with the general very «mild» hypothermia or normal

ными методами (число измерений: кролики $n=100$, пациенты $n=200$), было получено удовлетворительное совпадение данных: у животных — $\pm 0,23^{\circ}\text{C}$, у нейрохирургических пациентов — $\pm 0,52^{\circ}\text{C}$ [8].

Наличие расхождений имеет вполне объективные основания, заключающиеся в том, что при измерении температуры имплантированным термодатчиком объем ткани мозга, контактирующий с активной частью датчика, не превышает 10–20 мм³, тогда как СВЧ-радиотермометрия охватывает объем ткани до 1800 мм³ и фиксирует значения усредненной температуры во всем объеме. В тоже время, репрезентативность результатов подчеркивается проведением многократных измерений в разное время и разными исследователями. При СВЧ-радиотермометрии было обнаружено хорошее совпадение при повторных измерениях.

Исследование температуры коры больших полушарий у здоровых лиц ($n=120$) с применением СВЧ-радиотермометрии [7] показало, что применение КЦГ, позволяющей стабилизировать температуру кожи головы на уровне около 8–10 $^{\circ}\text{C}$, обеспечивало к 4-му часу охлаждения достоверное понижение средней температуры левого полушария от 36,74 $\pm$ 0,37 $^{\circ}\text{C}$ до 32,9 $\pm$ 0,26 $^{\circ}\text{C}$, а правого — от 36,64 $\pm$ 0,32 $^{\circ}\text{C}$ до 32,95 $\pm$ 0,26 $^{\circ}\text{C}$. Аксиальная температура при этом не изменилась. Отметим весьма точное совпадение этих результатов с расчетными, полученными в приведенной ранее работе [72].

Теми же авторами показано, что у пациентов в первые сутки развития ишемического инсульта ($n=121$) средняя температура левого полушария составила 37,11 $\pm$ 0,1 $^{\circ}\text{C}$, а правого 37,14 $\pm$ 0,1 $^{\circ}\text{C}$. После проведения 16-ти часового сеанса КЦГ температура левого полушария понизилась до 32,64 $\pm$ 0,54 $^{\circ}\text{C}$, правого — до 33,01 $\pm$ 0,45 $^{\circ}\text{C}$, а после 24-х часов охлаждения температура левого полушария достигла 31,05 $\pm$ 0,4 $^{\circ}\text{C}$, правого — 30,41 $\pm$ 0,2 $^{\circ}\text{C}$. Базальная температура оставалась в пределах 36–35,5 $^{\circ}\text{C}$, а такого рода мягкая общая гипотермия не сопровождалась развитием мышечной дрожи и не требовала дополнительной фармакологической коррекции.

Факт снижения температуры коры больших полушарий под влиянием КЦГ без значительных изменений базальной температуры подтвержден и в другом исследовании, которое также проводили неинвазивную СВЧ-радиотермометрию головного мозга у здоровых лиц и пациентов с ишемическим инсультом [9].

Кроме того, у нейрохирургических пациентов ($n=3$) с тяжелой ЧМТ после проведения декомпрессионной трепанации черепа и восстановления костного дефекта измеряли температуру мозга имплантированными в парен-

temperature may be preferable and safe both in the management of the acute period of brain damage and in the rehabilitation period, as well as in the prevention of neurodegenerative diseases.

Conclusion

The neuroprotective mechanisms of selective cerebral therapeutic hypothermia can be considered from the standpoint of metabolic depression and a series of reactions caused by genomic reprogramming of neurons. This will help outline the main promising trends in the use of this technique for achieving the hypothermic PC.

By increasing the brain tolerance in the acute period of disease, the CCH allows to reduce the temperature to a level creating the long-term neuronal resistance to pathogenic factors. This, in turn, supports not only urgent but also preventive use of the CCH, e. g. in scheduled revascularization interventions. It is reasonable to assume a positive impact of hypothermic effects on the brain in rehabilitation in order to increase the brain neuroregenerative potential and plasticity, and to limit the neurodegeneration.

The general hypothermia can neutralize the positive effects of the selective cerebral hypothermia, while the CCH is devoid of the negative consequences of lowering the body temperature. This is why their combination seems unreasonable.

Craniocerebral hypothermia helps control the cerebral hyperthermia and fever, while maintaining the normal temperature. The brain thermal balance disorders can be corrected using this technique which can be considered promising for management of fever-associated disorders.

химу головного мозга на глубину 6–7 см термодатчиками (Pressio®, Sophysa) [7]. Оказалось, что КЦГ вызывает быстрое понижение температуры мозга на 3–5 $^{\circ}\text{C}$.

Эти данные демонстрируют не только возможность понижения температуры поверхностных отделов головного мозга при охлаждении краниocereбральной области головы, но и то, что КЦГ достаточной длительности позволяет достичь значений температуры, соответствующих уровню инициации формирования гипотермического ПК.

Важно отметить, что при СВЧ-радиотермометрии у пациентов в первые-вторые сутки дебюта фокальной ишемии головного мозга вне зависимости от локализации очага поражения выявлялись области повышенной до 38–41 $^{\circ}\text{C}$ температуры, в 85% случаев совпадающие с проекциями первичного очага. Усредненная температура коры полушарий оказывалась выше на 0,5–0,7 $^{\circ}\text{C}$, чем у здоровых людей. То есть, в остром периоде ишемии практически у

всех пациентов развивалась церебральная гипотермия. В 32% случаев она протекала скрытно, без повышения базальной температуры. КИГ позволяла понизить среднюю температуру коры мозга, в том числе в очагах гипертермии, а у лихорадящих пациентов — нормализовать температуру тела, что подчеркивает церебропротективный потенциал КИГ [80].

Повышение температуры нейронов в остром периоде поражений головного мозга обусловлено развитием практически всех последовательностей ишемического каскада в области пенумбры [81]. Так, глутаматный «удар» и следующее за ним возбуждение нейронов неизбежно сопровождается ростом метаболизма, то есть повышением фокальной температуры. Нарушения клеточного дыхания с активацией свободно-радикальных процессов приводят к нарастанию неферментативного окисления, то есть активации неэффективного метаболизма, повышая температуру [82]. Воспаление приводит к «пожару» обмена и росту температуры. При этом, гипертермия обладает самостоятельным повреждающим действием на нейроны, вызывая их дополнительное возбуждение, усиливая реакции эксайтотоксичности, активируя провоспалительные процессы и замыкая порочные круги патогенеза [83].

Очевидно, для получения полной картины влияния КИГ на тепловые процессы в головном мозге необходимы дополнительные исследования. В тоже время, приведенные данные и полученные позитивные клинические эффекты применения методики у пациентов в остром периоде церебральных катастроф свидетельствуют о предпочтительности ее применения по сравнению с общим охлаждением.

Во-первых, при поражениях головного мозга развивается отек, повышается ВЧД, снижается церебральная перфузия. Из этого следует, что центральная доставка охлажденной крови к области пенумбры оказывается затруднена, а это единственный путь гипотермического воздействия на головной мозг при общем охлаждении. При КИГ отведение избытка теплоты осуществляется как конвекционно, так и путем кондукции (два пути теплоотведения), что кажется предпочтительнее.

Во-вторых, в отличие от общей гипотермии, КИГ обеспечивает очень «мягкое» понижение базальной температуры, может проводиться пациентам с различной характеристикой сознания, не требует дополнительной седации и контроля мышечной дрожи, снижает фармакологическую нагрузку на пациента. При КИГ не развиваются типичные осложнения и побочные эффекты, свойственные общей гипотермии и способные нивелировать позитивные эффекты охлаждения.

В-третьих, базовая терапия подразумевают применение большого числа препаратов различного типа действия, которые входят в «конфликт» с эндогенными механизмами ПК. Кетамин, барбитураты, пропофол, бета-адреноблокаторы, блокаторы кальциевых каналов блокируют развитие эффектов ПК. Препараты с антиоксидантным и противовоспалительным действием, гипогликемические препараты и гипергликемия обладают таким же эффектом [84–88].

Очевидно, приведенный перечень факторов, затрудняющих развитие позитивных эффектов гипотермии неполон. Тем не менее правомочно предположить, что недоказанность эффективности общей гипотермии при инсультах и ЧМТ в большой степени связана именно с ними. Гипотетически можно предположить развитие своеобразного «конфликта» между общей и церебральной гипотермией при фокальных поражениях головного мозга, развивающегося в связи с неоправданным понижением температуры внутренних органов.

Из этого предположения следует, что индукция селективной церебральной гипотермии достаточной глубины на фоне общей очень «мягкой» гипотермии или нормотермии может оказаться более предпочтительной и безопасной в терапии не только острого периода поражений головного мозга, но и в реабилитационном периоде, а также в предупреждении развития нейродегенеративных заболеваний.

Заключение

Анализ нейропротекторных механизмов селективной церебральной терапевтической гипотермии с позиций метаболической депрессии и комплекса реакций, вызванных геномным перепрограммированием нейронов, позволяет представить основные перспективные направления применения этой методики в аспекте гипотермического ПК.

Повышая толерантность головного мозга в остром периоде развития патологии, КИГ позволяет достичь такого уровня снижения температуры, который обеспечивает формирование долгосрочной устойчивости нейронов к действию патогенных факторов. В свою очередь, это свидетельствует в пользу не только срочного, но и превентивного применения КИГ, например, при планируемых реваскуляризационных вмешательствах. Правомочно предполагать позитивное влияние гипотермического воздействия на головной мозг при проведении реабилитационных мероприятий в целях повышения нейрорегенеративного потенциала и степени нейропластичности мозга, ограничения процессов нейродегенерации.

КЦГ позволяет избежать последствий негативного влияния понижения температуры тела, причем следует учитывать, что развитие общей гипотермии способно нивелировать эффекты селективной церебральной гипотермии, а их сочетание, по-видимому, не целесообразно.

Литература

1. Лабори А., Гюгенар П. Гибернотерапия в медицинской практике. М.: Медгиз; 1956: 281.
2. Неговский В.А. Оживление организма и искусственная гипотермия, М.: Медгиз; 1960: 302.
3. Lampe J.W., Becker L.B. State of the art in therapeutic hypothermia. *Annu Rev Med.* 2011; 11: 104–110. DOI: 10.1146/annurev-med-052009-150512
4. Bernard S.A., Buist M. Induced hypothermia in critical care medicine: a review. *Crit Care Med.* 2003; 31: 2041–2051. DOI: 10.1097/01.CCM.0000069731.18472.61
5. Den Hertog H.M., van der Worp H.B., Tseng M.C., Dippel D.V. Cooling therapy for acute stroke. *Cochrane Database Syst Rev.* 2009; 130: 3063–3074. DOI: 10.1002/14651858.CD001247.pub2
6. Cooper D.J., Nichol A.D., Bailey M., Bernard S. Effect of Early Sustained Prophylactic Hypothermia on Neurologic Outcomes Among Patients With Severe Traumatic Brain Injury: The POLAR Randomized Clinical Trial. *JAMA.* 2018; 320(21): 2211–2220. DOI: 10.1001/jama.2018.17075.
7. Чебоксаров Д.В., Шевелев О.А., Бутров А.В., Бунтина М.А. Радиотермометрия головного мозга при краниocereбральной гипотермии в остром периоде ишемического инсульта. *Новости анестезиологии и реаниматологии.* 2015; 1: 3–8.
8. Шевелев О.А., Бутров А.В., Каленова И.Е., Шарникова И.Е. Краниocereбральная гипотермия в терапии ишемического инсульта. Боль, обезбоживание, интенсивная терапия. 2012; 1: 605–608.
9. Бутров А.В., Шевелев О.А., Чебоксаров Д.В., Бунтина М.А. Применение краниocereбральной гипотермии у больных с острым нарушением мозгового кровообращения под контролем радиотермометрии. *Вестник интенсивной терапии.* 2014; 5: 47.
10. Торосян Б.Д., Бутров А.В., Шевелев О.А., Чебоксаров Д.В., Покатилова Н.С. Влияние краниocereбральной гипотермии на потребление кислорода, обмен и показатели центральной гемодинамики у пациентов в остром периоде ишемического инсульта. *Медицинский алфавит.* 2017; 17 (314): 29–32.
11. Rzechorzek N.M., Connick P., Patani R., Selvaraj B.T., Chandrana S. Hypothermic Preconditioning of Human Cortical Neurons Requires Proteostatic Priming. *EBioMedicine.* 2015; 2 (6): 528–535. DOI: 10.1016/j.ebiom.2015.04.004
12. Rzechorzek N.M. Hypothermic preconditioning in human cortical neurons: coupling neuroprotection to ontogenic reversal of tau. *Edinburgh Research Archive.* 2015. <http://hdl.handle.net/1842/15894>
13. Murry C.E., Jennings R.B., Reimer K.A. Preconditioning with ischemia: A delay of cell injury in ischemic myocardium. *Circulation.* 1986; 74: 1124–1136. DOI: 10.1161/01.CIR.74.5.1124
14. Khoury N., Koronowski K.B., Perez-Pinzon M.F. Long-term window of ischemic tolerance: An evolutionarily conserved form of metabolic plasticity regulated by epigenetic modifications? *Neurol Neuromedicine.* 2016; 1(2): 6–12. PMID: 27796011 PMCID: PMC5081687 DOI: 10.29245/2572.942x/2016/2.1021
15. Stenzel-Poore M.P., Stevens S.L., Simon R.P. Genomics of preconditioning. *Stroke.* 2004; 35: 2683–2686. DOI: 10.1161/01.STR.0000143735.89281.
16. Khoury N., Xu J., Stegelmann S.D., Jackson C.W., Koronowski K.B., Dave K.R., Young J.L., Perez-Pinzon M.A. Resveratrol Preconditioning Induces Genomic and Metabolic Adaptations within the Long-Term Window of Cerebral Ischemic Tolerance Leading to Bioenergetic Efficiency. *Mol Neurobiol.* 2019; 56 (6): 4549–4565. DOI: 10.1007/s12035-018-1380-6.
17. Jackson C.W., Escobar I., Xu J., Perez-Pinzon M.A. Effects of ischemic preconditioning on mitochondrial and metabolic neuroprotection: 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase and sirtuins. *Brain Circ.* 2018; 4: 54–61. PMID: 18417696 PMCID: PMC2678917 DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5471-07.2008
18. Jiang S., Wu Y., Fang D., Chen. Hypothermic preconditioning but not ketamine reduces oxygen and glucose deprivation induced neuronal injury correlated with downregulation of COX-2 expression in mouse hippocampal slices. *Journal of Pharmacological Sciences.* 2018; 137: 30–37. DOI: 10.1016/j.jphs.2018.04.001
19. Шевелев О.А., Бутров А.В. Технологии лечебной гипотермии в интенсивной терапии и реаниматологии. *Неотложная медицина.* 2010; 3: 45–49.
20. Busto R., Dietrich W.D., Globus M.Y. Small differences in intraschemic brain temperature critically determine the extent of ischemic neuronal injury. *Cereb Blood Flow Metab.* 1987; 7 (6): 729–738. DOI: 10.1038/jcbfm.1987.127
21. Ruborg R., Gunnarsson K., Ström J.O. Predictors of post-stroke body temperature elevation. *BMC Neurology.* 2017; 17: 218. DOI: 10.1186/s12883-017-1002-3.

КЦГ позволяет купировать церебральную гипертермию и лихорадку, поддерживая нормотермию. Возможность коррекции нарушений теплового баланса головного мозга с помощью КЦГ позволяет считать эту методику перспективной при патологических состояниях, сопровождающихся повышением температуры.

References

1. Labori A., Gyugenar P. Hybernotherapy in medical practice. M.: Medgiz; 1956: 281 [In Russ.].
2. Negovskiy V.A. Revitalization of the body and artificial hypothermia, M.: Medgiz; 1960: 302 [In Russ.].
3. Lampe J.W., Becker L.B. State of the art in therapeutic hypothermia. *Annu Rev Med.* 2011; 11: 104–110. DOI: 10.1146/annurev-med-052009-150512
4. Bernard S.A., Buist M. Induced hypothermia in critical care medicine: a review. *Crit Care Med.* 2003; 31: 2041–2051. DOI: 10.1097/01.CCM.0000069731.18472.61
5. Den Hertog H.M., van der Worp H.B., Tseng M.C., Dippel D.V. Cooling therapy for acute stroke. *Cochrane Database Syst Rev.* 2009; 130: 3063–3074. DOI: 10.1002/14651858.CD001247.pub2
6. Cooper D.J., Nichol A.D., Bailey M., Bernard S. Effect of Early Sustained Prophylactic Hypothermia on Neurologic Outcomes Among Patients With Severe Traumatic Brain Injury: The POLAR Randomized Clinical Trial. *JAMA.* 2018; 320(21): 2211–2220. DOI: 10.1001/jama.2018.17075.
7. Chebokarsy D. V., Shevelev O. A., Burov A. V., Bunina M. A. Radiothermometry of the brain in craniocerebral hypothermia in the acute period of ischemic stroke. *Novosti anesteziologii i reanimatologii.* 2015; 1: 3–8 [In Russ.].
8. Shevelev O. A., Burov A. V., Kalenova I. E., Sharinova I. E. Craniocerebral hypothermia in the therapy of ischemic stroke. *Bol, obezboivanie, intensivnaya terapiya.* 2012; 1: 605–608 [In Russ.].
9. Butrov A. V., Shevelev O. A., Chebokarsy D. V., Buntina M. A. The use of craniocerebral hypothermia in patients with acute impairment of cerebral circulation under the control of radiothermometry. *Vestnik intensivnoj terapii.* 2014; 5: 47 [In Russ.].
10. Torosyan B. D., Butrov A. V., Shevelev O. A., Chebokarsy D. V., Pokatilova N. S. Effect of craniocerebral hypothermia on oxygen consumption, metabolism and central hemodynamics in patients with acute ischemic stroke. *Medicinskij alfavit.* 2017; 17 (314): 29–32. [In Russ.].
11. Rzechorzek N.M., Connick P., Patani R., Selvaraj B.T., Chandrana S. Hypothermic Preconditioning of Human Cortical Neurons Requires Proteostatic Priming. *EBioMedicine.* 2015; 2(6): 528–535. DOI: 10.1016/j.ebiom.2015.04.004
12. Rzechorzek N.M. Hypothermic preconditioning in human cortical neurons: coupling neuroprotection to ontogenic reversal of tau. *Edinburgh Research Archive.* 2015. <http://hdl.handle.net/1842/15894>
13. Murry C.E., Jennings R.B., Reimer K.A. Preconditioning with ischemia: A delay of cell injury in ischemic myocardium. *Circulation.* 1986; 74: 1124–1136. DOI: 10.1161/01.CIR.74.5.1124
14. Khoury N., Koronowski K.B., Perez-Pinzon M.F. Long-term window of ischemic tolerance: An evolutionarily conserved form of metabolic plasticity regulated by epigenetic modifications? *Neurol Neuromedicine.* 2016; 1(2): 6–12. PMID: 27796011 PMCID: PMC5081687 DOI: 10.29245/2572.942x/2016/2.1021
15. Stenzel-Poore M.P., Stevens S.L., Simon R.P. Genomics of preconditioning. *Stroke.* 2004; 35: 2683–2686. DOI: 10.1161/01.STR.0000143735.89281.
16. Khoury N., Xu J., Stegelmann S.D., Jackson C.W., Koronowski K.B., Dave K.R., Young J.L., Perez-Pinzon M.A. Resveratrol Preconditioning Induces Genomic and Metabolic Adaptations within the Long-Term Window of Cerebral Ischemic Tolerance Leading to Bioenergetic Efficiency. *Mol Neurobiol.* 2019; 56 (6): 4549–4565. DOI: 10.1007/s12035-018-1380-6.
17. Jackson C.W., Escobar I., Xu J., Perez-Pinzon M.A. Effects of ischemic preconditioning on mitochondrial and metabolic neuroprotection: 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase and sirtuins. *Brain Circ.* 2018; 4: 54–61. PMID: 18417696 PMCID: PMC2678917 DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5471-07.2008
18. Jiang S., Wu Y., Fang D., Chen. Hypothermic preconditioning but not ketamine reduces oxygen and glucose deprivation induced neuronal injury correlated with downregulation of COX-2 expression in mouse hippocampal slices. *Journal of Pharmacological Sciences.* 2018; 137: 30–37. DOI: 10.1016/j.jphs.2018.04.001
19. Shevelev O.A., Butrov A.V. Technologies of therapeutic hypothermia in intensive care and resuscitation. *Neotlozhnaya meditsina.* 2010; 3: 45–49 [In Russ.].
20. Busto R., Dietrich W.D., Globus M.Y. Small differences in intraschemic brain temperature critically determine the extent of ischemic neuronal injury. *Cereb Blood Flow Metab.* 1987; 7(6): 729–738. DOI: 10.1038/jcbfm.1987.127
21. Ruborg R., Gunnarsson K., Ström J.O. Predictors of post-stroke body temperature elevation. *BMC Neurology.* 2017; 17: 218. DOI: 10.1186/s12883-017-1002-3.

22. Santillo E, Antonelli-Incalzi R. Protection of coronary circulation by remote ischemic preconditioning: An intriguing research frontier. *Cardiol. Plus*. 2018; 3: 21–29. DOI: 10.4103/cp.cp_9_18
23. Lange R, Ingwall J, Hale S.L. Preservation of high-energy 40. phosphates by verapamil in reperfused myocardium. *Circulation*. 1984; 70: 734–741.
24. Kremastinos D.Th. The phenomenon of preconditioning today. *Hell. J. Cardiol*. 2005; 46: 1–4.
25. Anwar Abd-Elfattah S., Jian-Huo Guo, Shi-Ping Gao, Ahmed Elwatidy F., Ibrahim Hegab M., David Salter R., Mohammad Alfagih R., Nermine Abd-Elfattah A. Preconditioning of Healthy, Stunned, Infarcted, Hypertrophied and Failing Hearts: Role of Conditioning Reserve in Supplemental Cardioprotection. *Clinics in Surgery*. 2019; 4: 1–13
26. Ravincero T., Farkasova V., Arkasova, Griecsova L., Carnicka S., Muraricova E., Barlaka E., Kolar F., Bartekova M., Lonek L., Slezak J., Lazou A. Remote Preconditioning as a Novel «Conditioning» Approach to Repair the Broken Heart: Potential Mechanisms and Clinical Applications. *Physiol. Res*. 2016; 65: 55–64.
27. Kawada T., Akiyama T., Shimizu S. Detection of endogenous acetylcholine release during brief ischemia in the rabbit ventricle: a possible trigger for ischemic preconditioning. *Life Sci*. 2009; 85: 597–601. DOI: 10.1016/j.lfs.2009.08.015
28. Headrick J.P., Lasley R.D. Adenosine receptors and reperfusion injury of the heart. *Handb. Exp. Pharmacol*. 2009; 193: 189–214. DOI: 10.1007/978-3-540-89615-9_7
29. Singh L., Kulshrestha R., Singh N., Jaggi A.S. Mechanisms involved in adenosine pharmacological preconditioning-induced cardioprotection. *Korean J Physiol Pharmacol*. 2018; 22 (3): 225–234. DOI: 10.4196/kjpp.
30. Wang C., Hu S.M., Xie H., Qiao S.G., Liu H., Liu C.F. Role of mitochondrial ATP-sensitive potassium channel-mediated PKC-ε in delayed protection against myocardial ischemia/reperfusion injury in isolated hearts of sevoflurane-preconditioned rats. *Braz J Med Biol Res*. 2015; 48 (6). DOI: 10.1590/1414-431x20143876
31. He A., Jiang Y., Gui C. The antiapoptotic effect of mesenchymal stem cell transplantation on ischemic myocardium is enhanced by anoxic preconditioning. *Can. J. Cardiology*. 2009; 25: 353–358. DOI: 10.1016/S0828-282X(09)70094-7
32. Randall M. Enhanced cardiac preconditioning in the isolated heart of the transgenic (mREN-2)27 hypertensive. *Cardiovascular Research*. 1997; 33: 400–409. PMID: 9074705
33. Лихванцев В.В., Мороз В.В., Гребенчиков О.А., Гороховатский Ю.И., Заржецкий Ю.В., Тимошин С.С., Левиков Д.И., Шайбакова В.Л. Ишемическое и фармакологическое preconditioning. *Общая реаниматология*. 2011; 7 (6): 59. DOI: 10.15360/1813-9779-2011-6-59.
34. Hausenloy D.J., Candilio L., Laing C., Kunst G., Pepper J., Kolvekar S., Evans R., Robertson S., Knight R., Ariti C., Clayton T., Yellon D. M. Effect of remote ischemic preconditioning on clinical outcomes in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery (ERICCA): rationale and study design of a multi-centre randomized double-blinded controlled clinical trial. *Clinical Research in Cardiology*. 2012; 101: 339–348. DOI: 10.1007/s00392-011-0397-x
35. Murry C.E., Richard V.J., Jennings R. B., Reimer K. A. Myocardial protection is lost before contractile function recovers from ischemic preconditioning. *Am. J. Physiol*. 1991; 260: 796–804. DOI: 10.1152/ajp-heart.1991.260.3.H796
36. Downey J.M., Cohen M.V. Preconditioning: Markers vs. epiphenomena. *Basic Research in Cardiology*. 1996; 91: 35–37. DOI: 10.1007/978-3-642-53793-6_45
37. Okubo S., Xi L., Bernardo N.L., Yoshida K., Kukreja R.C. Myocardial preconditioning: Basic concepts and potential mechanisms. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 1999; 196: 3–12. DOI: 10.1007/978-1-4615-5097-6_1
38. Park H.A., Jonas E.A. ΔN-Bcl-xL, a therapeutic target for neuroprotection. *Neural Regen Res*. 2017; 12: 1791–1794. DOI: 10.4103/1673-5374.219033
39. Gidday J.M. Cerebral preconditioning and ischaemic tolerance. *Nat Rev Neurosci*. 2006; 7: 437–448. DOI: 10.1038/nrn1927
40. Miller D.J., Fort P.E. Heat Shock Proteins Regulatory Role in Neurodevelopment. *Front. Neurosci*. 2018. DOI: 10.3389/fnins.2018.00821
41. Chang-Jin Park, Young-Su Seo. Heat Shock Proteins: A Review of the Molecular Chaperones for Plant. *Immunity Plant Pathol J*. 2015; 31 (4): 323–333. DOI: 10.5423/PJP.RW.08.2015.0150.
42. Chatterjee S., Burns N.F. Targeting Heat Shock Proteins in Cancer: A Promising Therapeutic Approach. *Int J Mol Sci*. 2017; 18 (9). DOI: 10.3390/ijms18091978.
43. Yan Jun Song Chong, Bin Zhong Xian., Bao Wang. Heat shock protein 70: A promising therapeutic target for myocardial ischemia-reperfusion injury. *J of cellular Physiology*. 2018; 234: 1190–1207. DOI: 10.1002/jcp.27110
44. Qi J. S., Kam K. W. L., Chen M., Wu S., Wong T. M. Failure to confer cardioprotection and to increase the expression of heat-shock protein 70 by preconditioning with a κ-opioid receptor agonist during ischaemia and reperfusion in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetologia*. 2004; 47: 214–220. DOI: /10.1007/s00125-003-1288-0
45. Gidday J.M. Cerebrovascular ischemic protection by pre- and post-conditioning. *Brain Circ*. 2015; 1: 97–103 DOI: 10.4103/2394-8108.166379
22. Santillo E, Antonelli-Incalzi R. Protection of coronary circulation by remote ischemic preconditioning: An intriguing research frontier. *Cardiol. Plus*. 2018; 3: 21–29. DOI: 10.4103/cp.cp_9_18
23. Lange R, Ingwall J, Hale S.L. Preservation of high-energy 40. phosphates by verapamil in reperfused myocardium. *Circulation*. 1984; 70: 734–741.
24. Kremastinos D.Th. The phenomenon of preconditioning today. *Hell. J. Cardiol*. 2005; 46: 1–4.
25. Anwar Abd-Elfattah S., Jian-Huo Guo, Shi-Ping Gao, Ahmed Elwatidy F., Ibrahim Hegab M., David Salter R., Mohammad Alfagih R., Nermine Abd-Elfattah A. Preconditioning of Healthy, Stunned, Infarcted, Hypertrophied and Failing Hearts: Role of Conditioning Reserve in Supplemental Cardioprotection. *Clinics in Surgery*. 2019; 4: 1–13
26. Ravincero T., Farkasova V., Arkasova, Griecsova L., Carnicka S., Muraricova E., Barlaka E., Kolar F., Bartekova M., Lonek L., Slezak J., Lazou A. Remote Preconditioning as a Novel «Conditioning» Approach to Repair the Broken Heart: Potential Mechanisms and Clinical Applications. *Physiol. Res*. 2016; 65: 55–64.
27. Kawada T., Akiyama T., Shimizu S. Detection of endogenous acetylcholine release during brief ischemia in the rabbit ventricle: a possible trigger for ischemic preconditioning. *Life Sci*. 2009; 85: 597–601. DOI: 10.1016/j.lfs.2009.08.015
28. Headrick J.P., Lasley R.D. Adenosine receptors and reperfusion injury of the heart. *Handb. Exp. Pharmacol*. 2009; 193: 189–214. DOI: 10.1007/978-3-540-89615-9_7
29. Singh L., Kulshrestha R., Singh N., Jaggi A.S. Mechanisms involved in adenosine pharmacological preconditioning-induced cardioprotection. *Korean J Physiol Pharmacol*. 2018; 22 (3): 225–234. DOI: 10.4196/kjpp.
30. Wang C., Hu S.M., Xie H., Qiao S.G., Liu H., Liu C.F. Role of mitochondrial ATP-sensitive potassium channel-mediated PKC-ε in delayed protection against myocardial ischemia/reperfusion injury in isolated hearts of sevoflurane-preconditioned rats. *Braz J Med Biol Res*. 2015; 48 (6). DOI: 10.1590/1414-431x20143876
31. He A., Jiang Y., Gui C. The antiapoptotic effect of mesenchymal stem cell transplantation on ischemic myocardium is enhanced by anoxic preconditioning. *Can. J. Cardiology*. 2009; 25: 353–358. DOI: 10.1016/S0828-282X(09)70094-7
32. Randall M. Enhanced cardiac preconditioning in the isolated heart of the transgenic (mREN-2)27 hypertensive. *Cardiovascular Research*. 1997; 33: 400–409. PMID: 9074705
33. Лихванцев В.В., Мороз В.В., Гребенчиков О.А., Гороховатский Ю.И., Заржецкий Ю.В., Тимошин С.С., Левиков Д.И., Шайбакова В.Л. Ишемическое и фармакологическое preconditioning. *Общая реаниматология*. 2011; 7 (6): 59. [In Russ.]. DOI: 10.15360/1813-9779-2011-6-59.
34. Hausenloy D.J., Candilio L., Laing C., Kunst G., Pepper J., Kolvekar S., Evans R., Robertson S., Knight R., Ariti C., Clayton T., Yellon D. M. Effect of remote ischemic preconditioning on clinical outcomes in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery (ERICCA): rationale and study design of a multi-centre randomized double-blinded controlled clinical trial. *Clinical Research in Cardiology*. 2012; 101: 339–348. DOI: 10.1007/s00392-011-0397-x
35. Murry C.E., Richard V.J., Jennings R. B., Reimer K. A. Myocardial protection is lost before contractile function recovers from ischemic preconditioning. *Am. J. Physiol*. 1991; 260: 796–804. DOI: 10.1152/ajp-heart.1991.260.3.H796
36. Downey J.M., Cohen M.V. Preconditioning: Markers vs. epiphenomena. *Basic Research in Cardiology*. 1996; 91: 35–37. DOI: 10.1007/978-3-642-53793-6_45
37. Okubo S., Xi L., Bernardo N.L., Yoshida K., Kukreja R.C. Myocardial preconditioning: Basic concepts and potential mechanisms. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 1999; 196: 3–12. DOI: 10.1007/978-1-4615-5097-6_1
38. Park H.A., Jonas E.A. ΔN-Bcl-xL, a therapeutic target for neuroprotection. *Neural Regen Res*. 2017; 12: 1791–1794. DOI: 10.4103/1673-5374.219033
39. Gidday J.M. Cerebral preconditioning and ischaemic tolerance. *Nat Rev Neurosci*. 2006; 7: 437–448. DOI: 10.1038/nrn1927
40. Miller D.J., Fort P.E. Heat Shock Proteins Regulatory Role in Neurodevelopment. *Front. Neurosci*. 2018. DOI: 10.3389/fnins.2018.00821
41. Chang-Jin Park, Young-Su Seo. Heat Shock Proteins: A Review of the Molecular Chaperones for Plant. *Immunity Plant Pathol J*. 2015; 31 (4): 323–333. DOI: 10.5423/PJP.RW.08.2015.0150.
42. Chatterjee S., Burns N.F. Targeting Heat Shock Proteins in Cancer: A Promising Therapeutic Approach. *Int J Mol Sci*. 2017; 18 (9). DOI: 10.3390/ijms18091978.
43. Yan Jun Song Chong, Bin Zhong Xian., Bao Wang. Heat shock protein 70: A promising therapeutic target for myocardial ischemia-reperfusion injury. *J of cellular Physiology*. 2018; 234: 1190–1207. DOI: 10.1002/jcp.27110
44. Qi J. S., Kam K. W. L., Chen M., Wu S., Wong T. M. Failure to confer cardioprotection and to increase the expression of heat-shock protein 70 by preconditioning with a κ-opioid receptor agonist during ischaemia and reperfusion in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetologia*. 2004; 47: 214–220. DOI: /10.1007/s00125-003-1288-0
45. Gidday J.M. Cerebrovascular ischemic protection by pre- and post-conditioning. *Brain Circ*. 2015; 1: 97–103 DOI: 10.4103/2394-8108.166379

46. Miyata Y., Yahara I. The 90 kDa heat shock protein Hsp90 binds and protects casein kinase II from self-aggregation and enhances its kinase activity. *J. Biol. Chem.* 1992; 267: 7042–7047.
47. Mosser D. D., Caron A. W., Bourget L. Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 1997; 17: 5317–5327. DOI: 10.1128/MCB.17.9.5317
48. Wang Y., Reis C., Applegate R., Stier G., Martin R., Zhang J.H. Ischemic conditioning-induced endogenous brain protection: Applications Pre-, Per- or Post-Stroke. *Exp Neurol.* 2015; 272: 26–40. DOI: 10.1016/j.expneurol.2015.04.009
49. Kitagawa K., Matsumoto M., Tagaya M. Ischemic tolerance phenomenon found in the brain. *Brain Res.* 1990; 528 (1): 21–24. DOI: 10.1016/0006-8993(90)90189-1
50. Yu S., Zhao M., Guo T. Hypoxic preconditioning up-regulates glucose transport activity and glucose transporter (GLUT1 and GLUT3) gene expression after acute anoxic exposure in the cultured rat hippocampal neurons and astrocytes. *Brain Res.* 2008; 1211: 22–29. PMID: 18474279 DOI: 10.1016/j.brainres.2005.04.029
51. Shpargel K.B., Jalabi W., Jin Y. Preconditioning paradigms and pathways in the brain. *Cleve Clin J Med.* 2008; 75 (2): 77. PMID: 18540152 DOI: 10.3949/ccjm.75.suppl.2.s77
52. Gidday J.M. Cerebral preconditioning and ischaemic tolerance. *Nat Rev Neurosci.* 2006; 7: 437–448. DOI: 10.1038/nrn1927
53. Guimarães Filho M.A., Cortez E., Garcia-Souza É.P., Soares Vde M., Moura A.S., Carvalho L., Maya MC, Pitombo MB. Effect of remote ischemic preconditioning in the expression of IL-6 and IL-10 in a rat model of liver ischemia-reperfusion injury. *Acta Cir Bras.* 2015; 30 (7): 452–460. DOI: 10.1590/S0102-865020150070000002
54. Nakano S., Kato H., Kogure K. Neuronal damage in the rat hippocampus in a new model of repeated reversible transient cerebral ischemia. *Brain Res.* 1989; 490 (1): 178–180. DOI: 10.1016/0006-8993(89)90448-4
55. Atochin D.N., Clark J., Demchenko I.T. Rapid cerebral ischemic preconditioning in mice deficient in endothelial and neuronal nitric oxide synthases. *Stroke.* 2003; 34 (5): 1299–1303. DOI: 10.1161/01.STR.0000066870.70976.57
56. Щербак, Н.С., Русакова А.Г., Галагудза М.М., Юкина Г.Ю., Баранцевич Е.Р., Томсон В.В., Шляхто Е.В. Изменение экспрессии белка Bcl-2 в нейронах поля гиппокампа после применения ишемического посткондиционирования головного мозга. *Морфология.* 2015; 148: 21–27.
57. Щербак, Н.С., Галагудза М.М., Юкина Г.Ю., Баранцевич Е.Р., Томсон В.В., Шляхто Е.В. Роль AMPA-рецепторов в механизмах нейропротективного эффекта ишемического посткондиционирования головного мозга. *Артериальная гипертензия.* 2015; 21: 155–163.
58. Щербак, Н.С., Овчинников Д.А., Галагудза М.М., Юкина Г.Ю., Баранцевич Е.Р., Томсон В.В., Шляхто Е.В. Влияние ишемического посткондиционирования на экспрессию белка Bcl-2 в нейронах неокортекса при глобальной ишемии-реперфузии головного мозга у крыс. *Трансляционная медицина.* 2016; 3 (1): 63–72.
59. Самойленкова Н.С., Гаврилова С.А., Кошелев В.Б. Защитный эффект гипоксического и ишемического прекодиционирования при локальной ишемии мозга крыс. *Доклады академии наук (ДАН).* 2007; 414 (2): 283–285.
60. Шевелев О.А., Каленова И.Е., Шапинова И.П., Бутров А.В. Опыт применения терапевтической гипотермии в лечении ишемического инсульта. *Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика.* 2012; 2: 41–45.
61. Шевелев О.А., Бутров А.В., Каленова И.Е. Терапевтическая гипотермия в неотложных состояниях. *Медицинский алфавит. Неотложная медицина.* 2011; 3: 46–50.
62. Doberentz E., Markwerth P., Wagner R., Madea B. Expression of Hsp27 and Hsp70 and vacuolization in the pituitary glands in cases of fatal hypothermia. *Forensic Science, Medicine and Pathology.* 2017; 13: 312–316. DOI: 10.1007/s12024-017-9884-3
63. Peretti D., Bastide A., Radford H., Verity N., Molloy C., Guerra Martin M., Moreno J.A., Steinert J.R., Smith T., Dinsdale D., Willis A.E., Malucci G.R. RBM3 mediates structural plasticity and protective effects of cooling in neurodegeneration. *Nature.* 2015; 518: 236–239.
64. Rzechorzek N.M. Hypothermic preconditioning in human cortical neurons: coupling neuroprotection to ontogenic reversal of tau. *Edinburgh Research Archive.* 2015.
65. Rzechorzek N.M., Connick P., Patani R., Selvaraj B.T., Chandrana S. Hypothermic Preconditioning of Human Cortical Neurons Requires Proteostatic Priming. *EBioMedicine.* 2015; 2 (6): 528–535. PMID: 26287272 PMID: PMC4534756 DOI: 10.1016/j.ebiom.2015.04.004
66. McIlvoy L. Comparison of brain temperature to core temperature: a review of the literature. *Journal of Neuroscience Nursing.* 2004; 36: 23–29. PMID: 14998103 DOI: 10.1097/01376517-200402000-00004
67. Hayward J.N., Baker M.A. Role of cerebral arterial blood in the regulation of brain temperature in the monkey. *Am. J. Physiol.* 1968; 215: 389–403. PMID: 4969787 DOI: 10.1152/ajplegacy.1968.215.2.389
68. Cabanac M., Brinnet H. Blood flow in the emissary veins of the human head during hyperthermia. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology.* 1985; 54 (2): 172–176. DOI: 10.1007/BF02335925
69. Mrozek S., Vardon F., Geeraerts T. Brain Temperature: Physiology and Pathophysiology after Brain Injury. *Anesthesiology Research and Practice.* 2012; Article ID 989487: 1–13. DOI: 10.1155/2012/989487
46. Miyata Y., Yahara I. The 90 kDa heat shock protein Hsp90 binds and protects casein kinase II from self-aggregation and enhances its kinase activity. *J. Biol. Chem.* 1992; 267: 7042–7047.
47. Mosser D. D., Caron A. W., Bourget L. Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 1997; 17: 5317–5327. DOI: 10.1128/MCB.17.9.5317
48. Wang Y., Reis C., Applegate R., Stier G., Martin R., Zhang J.H. Ischemic conditioning-induced endogenous brain protection: Applications Pre-, Per- or Post-Stroke. *Exp Neurol.* 2015; 272: 26–40. DOI: 10.1016/j.expneurol.2015.04.009
49. Kitagawa K., Matsumoto M., Tagaya M. Ischemic tolerance phenomenon found in the brain. *Brain Res.* 1990; 528 (1): 21–24. DOI: 10.1016/0006-8993(90)90189-1
50. Yu S., Zhao M., Guo T. Hypoxic preconditioning up-regulates glucose transport activity and glucose transporter (GLUT1 and GLUT3) gene expression after acute anoxic exposure in the cultured rat hippocampal neurons and astrocytes. *Brain Res.* 2008; 1211: 22–29. PMID: 18474279 DOI: 10.1016/j.brainres.2005.04.029
51. Shpargel K.B., Jalabi W., Jin Y. Preconditioning paradigms and pathways in the brain. *Cleve Clin J Med.* 2008; 75 (2): 77. PMID: 18540152 DOI: 10.3949/ccjm.75.suppl.2.s77
52. Gidday J.M. Cerebral preconditioning and ischaemic tolerance. *Nat Rev Neurosci.* 2006; 7: 437–448. DOI: 10.1038/nrn1927
53. Guimarães Filho M.A., Cortez E., Garcia-Souza É.P., Soares Vde M., Moura A.S., Carvalho L., Maya MC, Pitombo MB. Effect of remote ischemic preconditioning in the expression of IL-6 and IL-10 in a rat model of liver ischemia-reperfusion injury. *Acta Cir Bras.* 2015; 30 (7): 452–460. DOI: 10.1590/S0102-865020150070000002
54. Nakano S., Kato H., Kogure K. Neuronal damage in the rat hippocampus in a new model of repeated reversible transient cerebral ischemia. *Brain Res.* 1989; 490 (1): 178–180. DOI: 10.1016/0006-8993(89)90448-4
55. Atochin D.N., Clark J., Demchenko I.T. Rapid cerebral ischemic preconditioning in mice deficient in endothelial and neuronal nitric oxide synthases. *Stroke.* 2003; 34 (5): 1299–1303. DOI: 10.1161/01.STR.0000066870.70976.57
56. Shcherbak N.S., Rusakova A.G., Galagudza M.M., Yukina G.Yu., Barantsevich E.R., Tomson V.V., Shlyakhto E.V. Change of Bcl-2 protein expression in hippocampal neurons after ischemic brain postconditioning. *Morfologiya.* 2015; 148: 21–27 [In Russ.].
57. Shcherbak N.S., Galagudza M.M., Yukina G.Yu., Barantsevich E.R., Tomson V.V., Shlyakhto E.V. The Role of AMPA receptors in the mechanisms of neuroprotective effect of ischemic postconditioning of the brain. *Arterialnaya gipertenziya.* 2015; 21: 155–163 [In Russ.].
58. Shcherbak N. S., Ovchinnikov D. A., Galagudza M. M., Yukina G. Yu., Barantsevich E. R., Tomson V. V., Shlyakhto E. V. Effect of ischemic postconditioning on Bcl-2 protein expression in neocortex neurons in global cerebral ischemia-reperfusion in rats. *Translyatsionnaya meditsina.* 2016; 3 (1): 63–72 [In Russ.].
59. Samojlenkova N.S., Gavrilova S.A., Koshelev V.B. Protective effect of hypoxic and ischemic preconditioning in local cerebral ischemia of rats. *Doklady akademii nauk (Reports of the Academy of Sciences).* 2007; 414 (2): 283–285 [In Russ.].
60. Shevelev O. A., Kalenova I. E., Sharinova I. P., Butrov A. V. The experience of therapeutic hypothermia in the treatment of ischemic stroke. *Neurologiya, neyropsikhiatriya, psikhosomatika.* 2012; 2: 41–45 [In Russ.].
61. Shevelev O. A., Butrov A. V., Kalenova I. E. Therapeutic hypothermia in emergency conditions. *Meditsinskij alfavit. Neotlozhnaya meditsina.* 2011; 3: 46–50 [In Russ.].
62. Doberentz E., Markwerth P., Wagner R., Madea B. Expression of Hsp27 and Hsp70 and vacuolization in the pituitary glands in cases of fatal hypothermia. *Forensic Science, Medicine and Pathology.* 2017; 13: 312–316. DOI: 10.1007/s12024-017-9884-3
63. Peretti D., Bastide A., Radford H., Verity N., Molloy C., Guerra Martin M., Moreno J.A., Steinert J.R., Smith T., Dinsdale D., Willis A.E., Malucci G.R. RBM3 mediates structural plasticity and protective effects of cooling in neurodegeneration. *Nature.* 2015; 518: 236–239.
64. Rzechorzek N.M. Hypothermic preconditioning in human cortical neurons: coupling neuroprotection to ontogenic reversal of tau. *Edinburgh Research Archive.* 2015.
65. Rzechorzek N.M., Connick P., Patani R., Selvaraj B.T., Chandrana S. Hypothermic Preconditioning of Human Cortical Neurons Requires Proteostatic Priming. *EBioMedicine.* 2015; 2 (6): 528–535. PMID: 26287272 PMID: PMC4534756 DOI: 10.1016/j.ebiom.2015.04.004
66. McIlvoy L. Comparison of brain temperature to core temperature: a review of the literature. *Journal of Neuroscience Nursing.* 2004; 36: 23–29. PMID: 14998103 DOI: 10.1097/01376517-200402000-00004
67. Hayward J.N., Baker M.A. Role of cerebral arterial blood in the regulation of brain temperature in the monkey. *Am. J. Physiol.* 1968; 215: 389–403. PMID: 4969787 DOI: 10.1152/ajplegacy.1968.215.2.389
68. Cabanac M., Brinnet H. Blood flow in the emissary veins of the human head during hyperthermia. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology.* 1985; 54 (2): 172–176. DOI: 10.1007/BF02335925
69. Mrozek S., Vardon F., Geeraerts T. Brain Temperature: Physiology and Pathophysiology after Brain Injury. *Anesthesiology Research and Practice.* 2012; Article ID 989487: 1–13. DOI: 10.1155/2012/989487

- Поступила 15.04.19

Received 15.04.19

Правила для русскоязычных авторов журнала «Общая реаниматология»

с учетом рекомендаций российской Ассоциации научных редакторов и издателей (РАНРИ)
и International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) редакция 25.09.2018

Правовые и этические аспекты публикации рукописи

Условия публикации рукописи

— Рукописи публикуются при обязательном соблюдении автором этики и правил публикации (подробнее на сайте журнала: www.reanimatology.com).

— Рукописи публикуются с соблюдением норм авторского права и конфиденциального отношения к персональным данным авторов.

— Рукописи публикуются бесплатно.

— Рукописи, принятые в журнал, проходят рецензирование на оригинальность, этичность, значимость, адекватность статистической обработки данных на условиях конфиденциальности за исключением выявления фальсификации данных.

— Редколлегия оставляет за собой право сокращать и редактировать рукописи.

Причины снятия с печати и задержки публикации рукописи

— Рукописи, не соответствующие профилю журнала, не принимаются.

— Рукописи, ранее опубликованные, а также направленные в другой журнал или сборник, не принимаются. Исключение составляют переводы на русский/английский язык отдельных статей, имеющих большое практическое значение и/или представляющих особый научный интерес, определяемый актуальностью тематики, высокими индексом цитирования, запросом по ключевым словам.

— За некорректное оформление и недостоверность представляемых библиографических данных авторы несут ответственность вплоть до снятия рукописи с печати.

— Нарушение правил оформления рукописи, несвоевременный, а также неадекватный ответ на замечания рецензентов и научных редакторов приводят к задержке публикации до исправления указанных недостатков. При игнорировании замечаний рецензентов и научных редакторов рукопись снимается с дальнейшего рассмотрения.

— Рукописи отклоненных работ редакцией не возвращаются.

Интересы сторон: Автор/Редакция

Редакция оставляет за собой право считать, что:

— авторы, предоставившие рукопись для публикации в журнал «Общая реаниматология», согласны с условиями публикации и от-

клонения рукописи, а также с правилами ее оформления.

— автор, ответственный за переписку с редакцией, выражает позицию всего авторского коллектива.

Редакция и издательство не несут ответственности за мнения, изложенные в публикациях, а также за содержание рекламы.

Гарантии редакции

Любые рукописи, полученные редакцией для рецензирования, будут восприниматься как конфиденциальные документы. Они не могут быть показаны другим лицам и обсуждены с ними, за исключением лиц, уполномоченных редакцией.

Неопубликованные материалы, находящиеся в предоставленной статье, не будут использованы в собственном исследовании научного редактора и рецензентов без письменного разрешения автора.

Рецензент не будет допущен к рассмотрению рукописи, если имеет место конфликт интересов в его конкурентных, партнерских либо других отношениях с кем-либо из авторов, компаний или организаций, связанных с материалом публикации.

Авторы имеют право получить по запросу информацию в виде электронного письма о подготовке, оформлении и продвижении рукописи: journal_or@mail.ru; www.reanimatology.com. Автор, ответственный за переписку с редакцией, получает по электронной почте тексты рецензий; решение редколлегии о публикации или отклонении рукописи с обоснованием причины; верстку отредактированного варианта рукописи для получения авторского согласия на публикацию.

Гарантии Автора

Предоставленная в редакцию рукопись полностью оригинальна. Использование любых материалов, защищенных лицензией от несанкционированного воспроизведения, допускается только с письменного разрешения правообладателя(ей) и при обязательной ссылке на авторов.

Список авторов содержит только тех лиц, которые внесли ощутимый вклад в концепцию, проект, исполнение или интерпретацию заявленной работы, то есть тех лиц, которые соответствуют критериям авторства.

Рукопись не содержит материалов, запрещенных в открытой печати действующим законодательством России.

Конфликт интересов сторон: Автор/Редакция

Конфликт интересов сторон Автор/Редакция решается путем переговоров сторон, в случае неурегулированных путем переговоров разногласий — в соответствии с действующим законодательством РФ и международными нормативно-правовыми актами, регулирующими публикацию рукописей в научно-практических медицинских журналах.

Согласие на публикацию отредактированного материала выражает автор, ответственный за переписку с редакцией. После ознакомления с версткой он направляет в редакцию электронное письмо по одной из представленных форм:

1) Авторы* согласны на публикацию рукописи** в представленном виде.

2) Авторы* согласны на публикацию рукописи** после внесения в верстку следующих правок:... (далее следует перечень с указанием номера страницы гранок верстки, номера абзаца, номера строки в абзаце и самой правки).

*Указывается весь авторский состав. ** Указывается название рукописи.

Срок оповещения редакции о принятом авторами решении — не более 3-х дней с момента отправки верстки автору, ответственному за переписку с редакцией.

Внимание! На стадии верстки допускается правка опечаток, ошибочных цифр и слов. Редактирование материала (замена, исключение, добавление предложений, абзацев и иллюстративных блоков) не принимается. Существенные изменения верстки приводят к ее удорожанию и задержке выпуска в связи с переформатированием и обновлением перевода текста на английский язык. В таком случае редакция снимает материал с печати и переносит его публикацию в другой номер в отредактированном авторами виде.

Сроки продвижения рукописи

— Экспертиза на соответствие профилю журнала и правилам оформления — не более 3-х рабочих дней с момента поступления рукописи в редакцию.

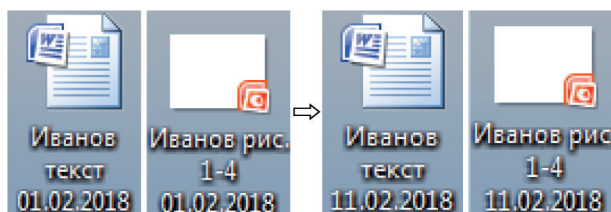
— Рецензирование — не более 20-и рабочих дней с момента электронной отправки рецензенту рукописи.

— Ответ автора рецензентам — не более 7-и рабочих дней с момента электронной отправки автору рецензии.

— Заседание редколлегии в очно-заочной форме — 1 раз в 2 месяца (в январе, марте, мае, июле, сентябре и ноябре) не позднее, чем за 1 месяц до выпуска тиража журнала.

Отправка материалов для публикации

Материалы для публикации на русском и английском языках следует направлять в виде



электронных файлов на сайт журнала: www.re-animatology.com, или по адресу редакции: journal_or@mail.ru. Формат подписи файлов: фамилия первого автора, обозначение материала (текст, иллюстрации и др.), дата (число, месяц, год). При обновлении версий рукописи и ее приложений (таблицы, иллюстрации) в формате подписи файлов меняется только дата.

Пример:

Внимание! Полностью автоматизированный перевод с русского языка на английский имеет низкое качество и не принимается. НКО Фонд «Медицина критических состояний» оказывает содействие в переводе материалов для публикации с русского языка на английский (справки по адресу редакции: journal_or@mail.ru).

Материал статей включает: 1) титульный лист 2) резюме и ключевые слова; 3) полный текст рукописи с подписями всех авторов на последней странице, подтверждающими их авторство и согласие с содержанием рукописи (последняя страница предоставляется в виде скана); 4) таблицы и иллюстрации (графики, диаграммы, фотографии, рисунки и т. п.) с номером, названием и примечанием; 5) библиографический список; 6) сопроводительное письмо.

Форма сопроводительного письма:

Главному редактору журнала
«Общая реаниматология»
Заслуженному деятелю науки России,
член-корреспонденту РАН, профессору
В. В. Морозу

Просим Вас рассмотреть возможность публикации ... (вид рукописи; Фамилии, Имена, Отчества всех авторов; название рукописи) в журнале «Общая реаниматология».

Авторы рукописи ознакомлены с Информацией для авторов журнала «Общая реаниматология» и согласны с правилами подготовки, подачи и публикации рукописи.

Данная рукопись не дублирует предыдущие публикации, в ней не затрагиваются интересы третьих сторон и не нарушаются этические нормы публикации.

Ответственный за переписку с редакцией: Имя, Отчество, Фамилия одного из авторов рукописи, e-mail, телефон.

Подпись руководителя учреждения.

Сопроводительное письмо должно быть напечатано на бланке учреждения, в котором выполнена работа.

Требования к печати

Вид: ориентация книжная, выравнивание по ширине, формат А4.

Шрифт: Times New Roman 12-го размера черного цвета.

Интервалы и отступы: межстрочный интервал в тексте — 1,5; межстрочный интервал в подписях к таблицам и иллюстрациям, в примечаниях — 1; интервал до и после абзаца — нет; отступ первой строки — 1,25 см; поля — 2,5 см со всех сторон.

Нумерация страниц: в правом нижнем углу.

Формат файлов: текст, таблицы, подписи к таблицам и иллюстрациям — Word; графики, диаграммы — Excel, Power Point; рисунки — jpeg; схемы — **ТОЛЬКО В РЕДАКТИРУЕМОМ ФОРМАТЕ** (Word; Power Point); фотографии — высокого разрешения, сохраненные в любом формате.

Рекомендуемое разрешение при сканировании: изображения с использованием линий и рисунки — 1200 dpi; фотографии, радиографии — не менее 300 dpi; фотографии, радиографии с текстом — не менее 600 dpi.

Единицы измерения должны соответствовать Международной системе единиц (СИ), температура — шкале Цельсия.

Формулы должны иметь четкую разметку всех элементов: строчных и прописных, а также латинских и греческих букв; подстрочных и надстрочных индексов. В случае цифр и букв, сходных по написанию (0 — цифра, O — буква), должны быть сделаны соответствующие пометки.

Названия

При описании аппаратуры в скобках указываются фирма и страна производитель.

Пример: Световой зонд одноканального аппарата ЛАКК-02 (НПП «ЛАЗМА», Россия).

При упоминании лекарств и препаратов используются международные непатентованные названия (INN). Торговые (патентованные) названия, под которыми препараты выпускаются различными фирмами, приводятся с указанием фирмы-изготовителя и их международного непатентованного (генерического) названия.

Пример: таривид (офлоксацин, «Хехст Мэрион Руссель»).

Латинские названия микроорганизмов приводятся в соответствии с современной классификацией, курсивом. При первом упоминании название микроорганизма дается полностью — род и вид, при повторном упоминании родовое название сокращается до одной буквы.

Пример: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptomyces lividans*; *E. coli*, *S. aureus*, *S. lividans*.

Названия генетических элементов даются в трехбуквенном обозначении латинского алфавита строчными буквами, курсивом (tet); кодируемыми соответствующими генетическими элементами продукты — прописными прямыми буквами (TET).

Виды и рекомендуемый объем рукописи

Обзорная статья, мета-анализ: не более 25-и страниц включая не более 10-и таблиц и иллюстраций в общем количестве; список цитируемой литературы — не менее 80-и наименований.

Заказанная или переводная статья: по договоренности.

Оригинальная статья: не более 15-и страниц, включая не более 6-и таблиц и иллюстраций в общем количестве; список цитируемой литературы — не менее 25-и наименований.

Краткая статья: не более 10-и страниц, включая не более 4-х таблиц и иллюстраций в общем количестве; список цитируемой литературы — не менее 15-и наименований.

Дискуссионная статья (включает 1—2 вопроса для обсуждения): не более 5-и страниц, включая не более 2-х таблиц и иллюстраций в общем количестве; список цитируемой литературы — не более 20-и наименований.

Письмо в редакцию: не более 600-а слов. Письма, адресованные сотрудникам редакции, не публикуются.

Внимание! В библиографии рекомендуется приводить не менее 30% источников 5-летней давности, включая текущий год.

Структурные разделы статей и рекомендации по их написанию

Все структурные разделы начинаются с нового абзаца. Их названия выделяются жирным шрифтом.

Далее см. на сайте www.reanimatology.com.

САНАТОРНО-КУРОРТНОЕ ЛЕЧЕНИЕ

Важным этапом на пути к полноценной активной жизни (выздоровлению) являются лечебно-профилактические мероприятия под наблюдением опытных докторов и заботливого персонала.

САНАТОРИЙ «ЛЫТКИНО»

Расположен на территории НИИ Реабилитологии дер. Лыткино, Московской области

- Возможность прохождения высокотехнологичных медицинских исследований;
- Реабилитационные программы;
- Консультации ведущих специалистов НИИ Реабилитологии
- Бассейны и терренкур

САНАТОРИЙ «УЗКОЕ»

Здравница расположена в юго-западном округе Москвы, в живописном месте площадью 155 га. Ухоженная зеленая территория, окруженная вековыми соснами и елями, пруды.

ИНКЛЮЗИВНЫЙ РЕАБИЛИТАЦИОННЫЙ КОМПЛЕКС «ПОРЕЧЬЕ»

Расположенный на 44 гектарах в экологически чистом хвойном лесу под Звенигородом.

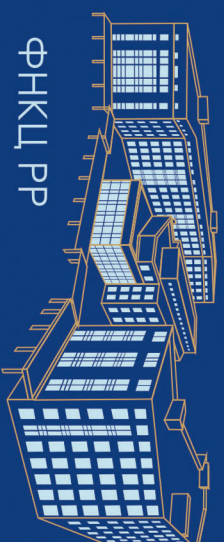
- Комфортные жилые корпуса;
- Спортивные сооружения на открытом воздухе для проведения спортивных мероприятий и оздоровительных занятий;
- Тренажерный зал;
- Кафе, столовая, банкетный зал;
- Аудитории для занятий, лекториев и других мероприятий.

ДОМ УЧЕНЫХ В ПОС. МОЗЖИНКА

Расположен в центре «Русской Швейцарии» возле Звенигорода, на берегу реки Москвы. Дом ученых был построен в 1955 г. для обслуживания академиков АН СССР и их семейств, проживающих в академических посёлках Можжинка и Лудино, и является местом их культурного отдыха.

Дом ученых сегодня — это:

- Библиотека
- Развивающие и музыкальные занятия с детьми
- Спектакли для детей
- Концерты классической музыки
- Художественные и фото выставки
- Спортивные секции
- Музей истории Можжинки
- Благоустроенная детская площадка



ФНКИ РР

НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ РЕАБИЛИТОЛОГИИ

Московская область, Солнечногорский район, с/п. Соколовское, Деревня Лыткино, д. 777
8 (495) 641-30-06 fkisr@fki.rg.ru

«НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ОБЩЕЙ РЕАНИМАТОЛОГИИ ИМЕНИ ВА. НЕГОВСКОГО»

г. Москва, ул. Петровка, д. 25, стр. 2
8 (495) 694-27-08 niior@fki.rg.ru

ИНСТИТУТ ВЫСШЕГО И ДОПОЛНИТЕЛЬНОГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ

г. Москва, ул. Петровка, д. 25, стр. 2
8 (495) 650-96-77 edu@fki.rg.ru

САНАТОРИЙ «УЗКОЕ»

г. Москва, ул. Профсоюзная, д. 123 А, стр. 14
8 (495) 427-94-33 san-uzkoe@fki.rg.ru

ДОМ УЧЁНЫХ В ПОС. МОЗЖИНКА

Московская область,

Одинцовский район, п. Можжинка, Дом учёных
8 (495) 992-53-28 dom_uchenyh@fki.rg.ru

ИНКЛЮЗИВНЫЙ РЕАБИЛИТАЦИОННЫЙ КОМПЛЕКС «ПОРЕЧЬЕ»

Московская область,
Одинцовский городской округ,
Деревня Салыково
8 (495) 992-54-64 ik@fki.rg.ru

www.fki.rg.ru

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО
ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ



ФНКИ РР

МИССИЯ ФНКИ РР – через истину
медицинской науки – к здоровью
и возвращению к качественной
жизни в социуме.

Директор
Член-корреспондент РАН
А.В. Трежко