

Длительное применение ингибиторов дипептидилпептидазы-4 подавляет системный окислительный стресс у крыс с диабетом 2-го типа

С.С. Болевич¹, П.Ф. Литвицкий¹, В. Яковлевич², С.Б. Болевич¹

¹ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), г. Москва, Россия;

²Факультет медицинских наук Крагуевацкого Университета, г. Крагуевац, Сербия

Аннотация

Одним из основных механизмов формирования микро- и макрососудистых ангиопатий у пациентов с сахарным диабетом 2-го типа (СД 2) служит индукция окислительного стресса.

Цель. Изучить влияние трехнедельного применения ингибиторов дипептидилпептидазы-4 (ДПП-4) на показатели окислительного стресса и состояние системы антиоксидантной защиты у крыс с индуцированным СД 2.

Материалы и методы. 60 крыс линии Wistar albino разделены на 5 групп: группа 1 (контроль) – интактные животные. У крыс в группах 2–5 с помощью стрептозотоцина моделирован СД 2. В следующие 3 нед группа 2 не получала лечения, в группе 3 вводили саксаглиптин (0,45 мг/кг), в группе 4 – ситаглиптин (0,6 мг/кг), в группе 5 – вилдаглиптин (9 мг/кг). По завершении эксперимента животных анестезировали и брали кровь для определения уровня супероксидного анион-радикала (O_2^-), перекиси водорода (H_2O_2), нитрита (NO_2^-), восстановленного глутатиона, а также активность каталазы и супероксиддисмутазы (СОД) с помощью диодноматричного спектрофотометра.

Результаты. Индуцирование СД 2 вызывало статистически значимое увеличение уровня активных форм кислорода: O_2^- и H_2O_2 ; снижение уровня: NO_2^- , восстановленного глутатиона, активности каталазы и СОД. Введение ингибиторов ДПП-4 в группах 3–5 приводило к подавлению избыточной генерации O_2^- и H_2O_2 (эффект наиболее выражен у вилдаглиптина) и повышению активности каталазы и СОД (эффект наиболее выражен у ситаглиптина) по сравнению с группой 2. Однако эти показатели не достигали значений, регистрируемых в группе 1. Введение всех трех ДПП-4 приводило к достижению цифр, сопоставимых с контролем по уровню NO_2^- . По уровню малонового диальдегида различий между группами не установлено.

Выводы. Ингибиторы ДПП-4 подавляют системный окислительный стресс у крыс с индуцированным СД 2 за счет торможения генерации прооксидантов и повышения активности антиоксидантной защиты.

Ключевые слова: диабет 2-го типа, саксаглиптин, ситаглиптин, вилдаглиптин, окислительный стресс, антиоксидантная защита.

Рубрики MeSH:

ДИАБЕТ САХАРНЫЙ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ - ЛЕКАРСТВЕННАЯ ТЕРАПИЯ

ДИАБЕТ САХАРНЫЙ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ - ОСЛОЖНЕНИЯ

ДИАБЕТ САХАРНЫЙ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ - ПАТОФИЗИОЛОГИЯ

ОКСИДАТИВНЫЙ СТРЕСС - ДЕЙСТВИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

ВИЛДАГЛИПТИН - ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

ВИЛДАГЛИПТИН - ФАРМАКОЛОГИЯ

Для цитирования: Болевич С.С., Литвицкий П.Ф., Яковлевич В., Болевич С.Б. Длительное применение ингибиторов дипептидилпептидазы-4 подавляет системный окислительный стресс у крыс с диабетом 2-го типа. Сеченовский вестник. 2019; 10 (4): 21–30. DOI: 10.26442/22187332.2019.4.21-30

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ:

Болевич Стефани Сергеевна, ассистент кафедры патофизиологии ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет).

Адрес: ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2, г. Москва, 119991, Россия

Тел.: +7 (903) 787-44-66

E-mail: alistra555@mail.ru

Статья поступила в редакцию: 02.10.2019

Статья принята к печати: 02.12.2019

Long-term use of dipeptyl peptidase-4 inhibitors suppresses systemic oxidative stress in rats with type 2 diabetes

Stefani S. Bolevich¹, Peter F. Litvitsky¹, Vladimir Jakovljevic², Sergej B. Bolevich¹

¹Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia;

²Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

Abstract

Induction of oxidative stress is one of the main mechanisms responsible for the development of micro- and macrovascular angiopathy in patients with type 2 diabetes mellitus (DM-2).

Aim. To evaluate the influence of long-term treatment with inhibitors of dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) on the characteristics of oxidative stress and the state of antioxidant defense system in rats with induced DM 2.

Materials and methods. We divided 60 Wistar albino rats into 5 groups: group 1 (control) – normal animals; groups 2–5 – rats with DM 2, induced by streptozotocin: group 2 – without treatment with DPP 4; group 3 – rats, treated with saxagliptin (0.45 mg/kg); group 4 – rats, treated with sitagliptin for 3 weeks (0.6 mg/kg); group 5 – rats, treated with vildagliptin (9 mg/kg). At the end of the experimental phase we determined the level of superoxide anion radical (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2), nitrite (NO_2^-), reduced glutathione, as well as the activity of catalase and superoxide dismutase (SOD) in the blood of rats using a diode array spectrophotometer.

Results. Induction of DM-2 in experimental animals led to a significant increase of reactive oxygen species (ROS): superoxide radical and hydrogen peroxide and to decrease in NO_2^- , reduced glutathione, catalase and SOD activity. Comparing groups 3–5 with group 2, treatment with DPP-4 inhibitors reduced excessive generation of superoxide radical (O_2^-) and hydrogen peroxide (H_2O_2) (especially significant in the group with vildagliptin) and increased the activity of catalase and superoxide dismutase (especially significant in the group with v sitagliptin) but the normal values, received in group 1, were not reached. Treatment with all DPP-4 inhibitors brought the level of nitrite (NO_2^-) up to normal, comparable with group 1.

Conclusions. DPP-4 inhibitors suppress systemic oxidative stress in rats with induced DM 2 via reduction of prooxidative molecules production and activation of antioxidant defensive system.

Keywords: type 2 diabetes mellitus, saxagliptine, sitagliptine, vildagliptine, oxidative stress, antioxidant defensive system.

MeSH terms:

DIABETES MELLITUS, EXPERIMENTAL - DRUG THERAPY

DIABETES MELLITUS, EXPERIMENTAL - COMPLICATIONS

DIABETES MELLITUS, EXPERIMENTAL - PHYSIOPATHOLOGY

OXIDATIVE STRESS - DRUG EFFECTS

VILDAGLIPTIN - THERAPEUTIC USE

VILDAGLIPTIN - PHARMACOLOGY

For citation: Bolevich S.S., Litvitsky P.F., Jakovljevic V., Bolevich S.B. Long-term use of dipeptyl peptidase-4 inhibitors suppresses systemic oxidative stress in rats with type 2 diabetes. Sechenov Medical Journal. 2019; 10 (4): 21–30. DOI: 10.26442/22187332.2019.4.21-30

CONTACT INFORMATION:

Stefani S. Bolevich, Assistant Professor at the Pathophysiology Department, Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University).

Address: 8/2 Trubetskaya st., Moscow, 119991 Russian Federation

Tel.: +7 (903) 787-44-66

E-mail: alistra555@mail.ru

The article received: 02.10.2019

The article approved for publication: 02.12.2019

Список сокращений

АФК – активные формы кислорода

ГПК – глюкоза плазмы крови

ДПП-4 – дипептидилпептидаза 4

ИПОЛ – индекс перекисного окисления липидов

МДА – малоновый диальдегид

СД 2 – сахарный диабет 2-го типа

СОД – супероксиддисмутаза

MW (molecular weight) – молекулярная масса

Сахарный диабет (СД) представляет собой группу метаболических заболеваний, основной характеристикой которых является гипергликемия, вызванная недостаточностью эффектов инсулина [1]. Распространенность СД в целом составляет около 8,3%. Следовательно, в мире примерно у 415 млн человек уже поставлен диагноз СД и это число постоянно растет, особенно в развитых странах [2]. СД 2-го типа (СД 2) встречается в популяции наиболее часто – не менее 95% всех страдающих СД. У этих пациентов наблюдается достаточная секреция инсулина, но на уровне клеток тканей и органов его эффекты недостаточны. Это приводит к увеличению уровня глюкозы плазмы крови (ГПК) и неспособности клеток использовать глюкозу для оптимального энергетического обеспечения пластических процессов и их функции [3].

В условиях хронической гипергликемии и больших суточных колебаний уровня ГПК у этих пациентов формируются тяжелые осложнения, включая микро- и макроангиопатии [4]. Основой их развития являются два патогенных механизма: избыточная интенсификация окислительного стресса и нарушения в системе иммунобиологического надзора за постоянством антигенного состава организма [5].

Показано, что ежедневные колебания уровня ГПК при хронической гипергликемии создают условия для чрезмерной активации окислительного стресса [5]. Этот факт необходимо учитывать при разработке стратегии применения противодиабетических средств для оптимального контроля уровня ГПК.

Доказано, что чрезмерная активация окислительного стресса при СД является результатом избыточной генерации активных форм кислорода (АФК), неферментативного гликозилирования белков и их окислительной дегградации [6]. Использование метформина для лечения пациентов с СД 2 в качестве препарата первого выбора выявило факт снижения его эффективности с годами. Это требует поиска препаратов для эффективного контроля гликемии.

В последние годы показано также, что для лечения СД 2 успешно используются глиптины – ингибиторы активности дипептидилпептидазы-4 (ДПП-4). С момента введения ситаглиптина в клиническую практику в 2006 г. ингибиторы ДПП-4 все чаще применяются для лечения СД 2. Ингибиторы ДПП-4 включают две группы препаратов: пептидомиметики (например, саксаглиптин и вилдаглиптин) и непептидомиметики (например, ситаглиптин).

Обе группы действуют как конкурирующие ингибиторы ДПП-4, но пептидомиметики содержат нитрильную группу и создают обратимые ковалентные связи между лекарственным средством и ферментом. При этом пептидомиметики распадаются медленно. Непептидомиметики, в отличие от этого, образуют нековалентные связи с каталитическим ферментным

доменом, что приводит к его мгновенному ингибированию [7]. Указанные различия ДПП-4 обуславливают также и разницу в механизмах их действия, их метаболических путей, а также – стратегии дозирования. Учитывая, что у пациентов с СД имеются существенные различия в суточных колебаниях уровня ГПК при использовании различных ингибиторов ДПП-4, возникает вопрос: отличается ли реакция организма пациентов на окислительный стресс?

Учитывая приведенные факты, в настоящей работе поставлена **цель** – изучить влияние длительного (в течение 3 нед) применения различных ингибиторов ДПП-4: саксаглиптина, ситаглиптина и вилдаглиптина на показатели окислительного стресса и состояние системы антиоксидантной защиты у крыс с индуцированным СД 2.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

При проведении исследований соблюдены требования Директивы ЕС по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях 86/609/ЕЕС, а также принципы этики. Протокол эксперимента одобрен Комитетом по этике в интересах экспериментальных животных Факультета медицинских наук Университета г. Крагуевац.

Препараты, использованные в исследовании, – стрептозотонин (молекулярная масса – molecular weight [MW]=265,221 а.е.м.), ситаглиптин (MW=523,32 а.е.м.), саксаглиптин (MW=315,41 а.е.м.) и вилдаглиптин (MW=303,399 а.е.м) – поставлены Sigma-Aldrich hemie Gmb HEschenstr., Германия.

Индукция сахарного диабета 2-го типа

В работе использованы крысы в возрасте 6 нед и массой тела 250 ± 30 г. Животные получали корм с высоким содержанием жира в течение 4 нед. После 4-й недели такой диеты и последующего 12-часового ночного голодания однократно внутрибрюшинно вводили стрептозотонин в дозе 25 мг/кг. Через 72 ч в плазме крови измеряли уровни глюкозы и инсулина. Крысы с уровнем ГПК более 7 ммоль/л и инсулина более 6 ммоль/л включались в исследование как животные с индуцированной моделью СД 2.

Для исследования использовали 60 крыс самцов Wistar albino массой тела 250 ± 30 г. Животных помещали в разные клетки (по 4 в одной) в виварии с контролируемой влажностью, температурой ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), освещением (цикл 12/12 свет/темнота). Все крысы были разделены на 5 групп, по 12 в каждой группе. Первая группа: интактные животные, которые находились на стандартной диете (10% жира, 24% белка, 57% крахмала, 9% клетчатки). Другие четыре группы (2–5) составляли животные с индуцированным СД 2, которые получали корм с высоким содержанием жира (26% жира, 16% белка,



РИС. 1. Схема исследования.
FIGURE 1. Design of the study.

52% крахмала, 6% клетчатки). Крысам в 3–5-й группах ежедневно в течение 3 нед внутрибрюшинно вводились препараты ингибиторов ДПП-4: саксаглиптин в дозе 0,45 мг/кг (группа 3), ситаглиптин в дозе 0,6 мг/кг массы тела (группа 4), вилдаглиптин в дозе 9 мг/кг (группа 5). В группе 2 крысы с индуцированным СД 2 не получали ингибиторов ДПП-4 (рис. 1).

Выбор доз препаратов основан на данных недавнего исследования на людях, в котором изучалось действие ингибиторов ДПП-4 у пациентов с СД 2. На основании доз препаратов, использованных в этом исследовании, рассчитана доза для животных в мг/кг массы тела [8].

Биохимические методы

После завершения 7 нед экспериментального протокола у анестезированных внутрибрюшинным применением кетамина (10 мг/кг) и ксилазина (5 мг/кг) животных из хвостовой вены с помощью стеклянной пробирки с цитратом натрия брали 5 мл крови для анализа параметров окислительного стресса и антиоксидантной защиты. Немедленно после взятия пробы крови она центрифугировалась для отделения ее плазмы. Форменные элементы крови промывались дистиллированной водой в соотношении 1:7 для лизиса эритроцитов и оценки состояния факторов антиоксидантной защиты. Полученные таким образом образцы хранились в холодильнике при температуре -80°C .

Для определения уровней прооксидантных факторов использовали плазму крови, в которой с помощью диодноматричного спектрофотометра Spedord S-600 (Analytik Jena, United Kingdom) по описанным нами ранее методикам [9] исследовались:

- содержание супероксидного анион-радикала (O_2^-) на основе реакции O_2^- с нитросиним тетразолием с образованием нитроформазаинового синего, тестируемого при длине волны 550 нм;
- уровень перекиси водорода (H_2O_2) в условиях окисления фенолового красного пероксидом водорода, катализируемого пероксидазой, при длине волны 610 нм;
- концентрация нитрита (NO_2^-) с использованием реактива Грисса, образующего диазокомплекс

фиолетового цвета с нитритами. После стабилизации цвета при комнатной температуре в течение 5–10 мин определяли концентрации высвобождаемого нитрита при длине волны 550 нм;

- индекс перекисного окисления липидов (ИПОЛ), который рассчитывали на основе спектрофотометрического определения при длине волны в 530 нм одного из конечных продуктов перекисного окисления липидов – малонового диальдегида (МДА) с помощью тиобарбитуровой кислоты; концентрацию ИПОЛ рассчитывали на основе следующего уравнения: $\text{нмоль ИПОЛ/мл образца} = \text{dA} (\text{Au-Asp}) / 1,56 \times 1,5$, где Au – абсорбент образца, Asp – абсорбент контроля, 1,56 и 1,25 – поправочные коэффициенты;
- активность каталазы, тестируемую после разбавления лизата эритроцитов дистиллированной водой в соотношении 1:7 и добавления этанола в соотношении 0,6:1. 50 мкл каталазного буфера, 100 мкл образца, 1 мл 10 мМ H_2O_2 помещали в пробирку и активность каталазы измеряли при длине волны 360 нм;
- активность супероксиддисмутазы (СОД), определяемую с использованием адреналинового метода по Бейтлеру. При перемешивании 100 мкл лизата эритроцитов с 1 мл карбонатного буфера добавляли 100 мкл адреналина и проводили измерение при длине волны 470 нм;
- содержание восстановленного глутатиона, выявляемое в реакции окисления глутатиона 5,5-дитио-бис-6,2-нитробензойной кислотой по методу Бейтлера, проводили при длине волны 450 нм.

Статистическая обработка данных

Для анализа полученных в работе фактических данных использовали: t-критерий Стьюдента, парный t-критерий, критерий Манна–Уитни, точный тест Фишера. Кроме того, проводили однофакторный и двухфакторный дисперсионный анализ. Для определения разницы между параметрами в различных группах животных использовали поправку Бонферрони для множественных сравнений. Критическое значение уровня статистической значимости при проверке нулевых гипотез принималось равным 0,05. Статистическая обработка данных осуществлялась в пакете SPSS v 20.0 (SPSS: An IBM Company, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние трехнедельного применения ингибиторов ДПП-4 на содержание прооксидантов в плазме крови

Индукция СД 2 сопровождалась снижением уровня в плазме крови монооксида азота в форме нитрита (рис. 2А). Применение в течение 3 нед каждого из трех препаратов ингибиторов ДПП-4 в 3, 4 и 5-й группах животных с СД 2 приводило к статисти-

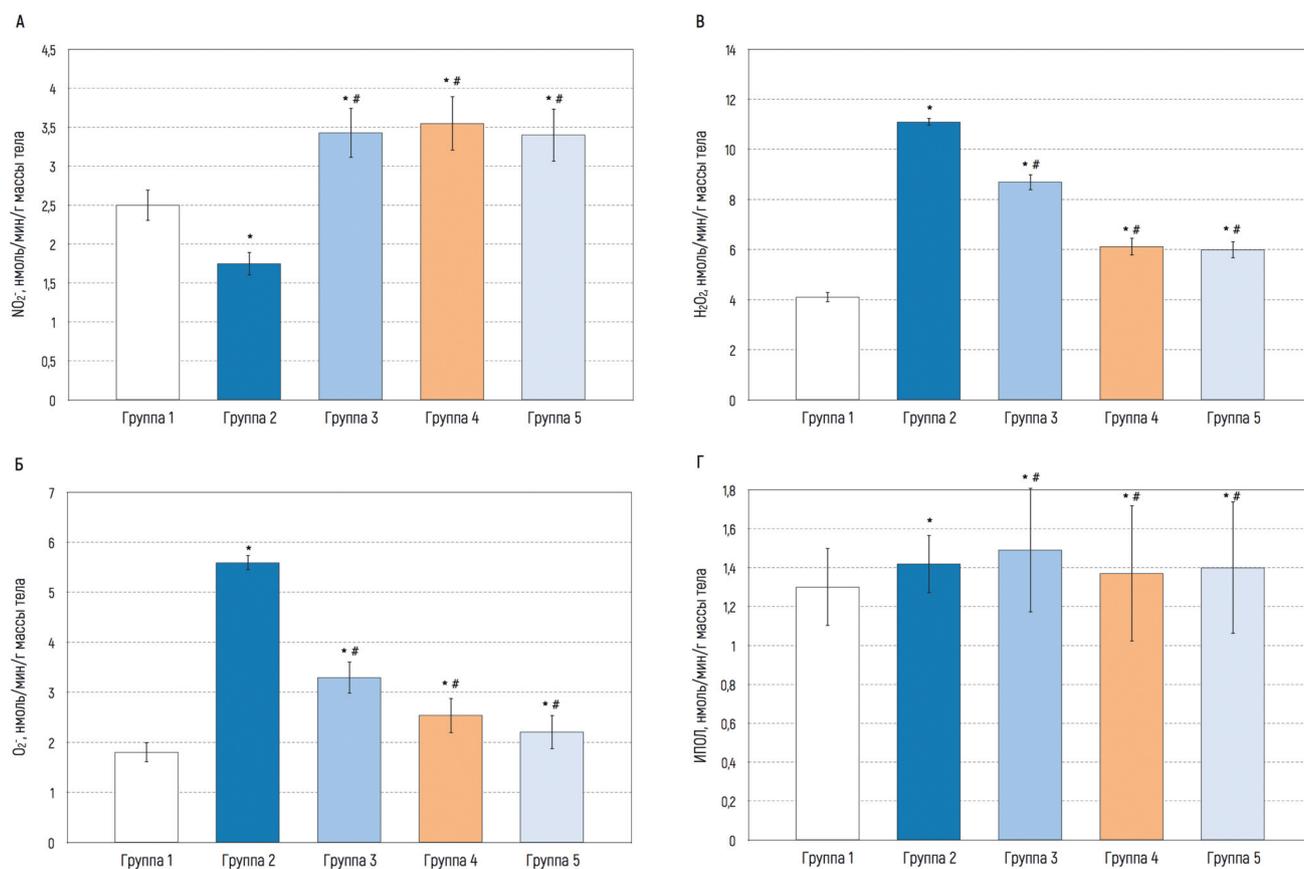


РИС. 2. Влияние ингибиторов ДПП-4 на содержание ($M \pm m$) прооксидантных факторов в плазме крови у крыс различных групп (нмоль/мин/г массы тела): А – монооксид азота; Б – O_2^- ; В – H_2O_2 ; Г – ИПОЛ (по малоновому диальдегиду).

Примечание. Группа 1 – интактный контроль, группа 2 – индуцированный СД без применения ДПП-4, группа 3 – индуцированный СД + саксаглиптин, группа 4 – индуцированный СД + ситаглиптин, группа 5 – индуцированный СД + вилдаглиптин. * $p < 0,05$ в сравнении с интактным контролем (группа 1); # $p < 0,05$ в сравнении с группой с индуцированным СД без применения ингибиторов ДПП-4 (группа 2); * $p < 0,05$ по сравнению с группой 3.

FIGURE 2. The influence of DPP-4 inhibitors on the level ($M \pm m$) of prooxidant factors in serum of rats in different groups (nmol/min/g of weight): A – Nitrogen monoxide; B – O_2^- ; C – H_2O_2 ; D – Lipid peroxidation index (per malondialdehyde).

Notes. Group 1 – intact control, group 2 – induced DM without DPP-4 inhibitors, group 3 – induced DM + saxagliptin, group 4 – induced DM + sitagliptin, group 5 – induced DM + vildagliptin.

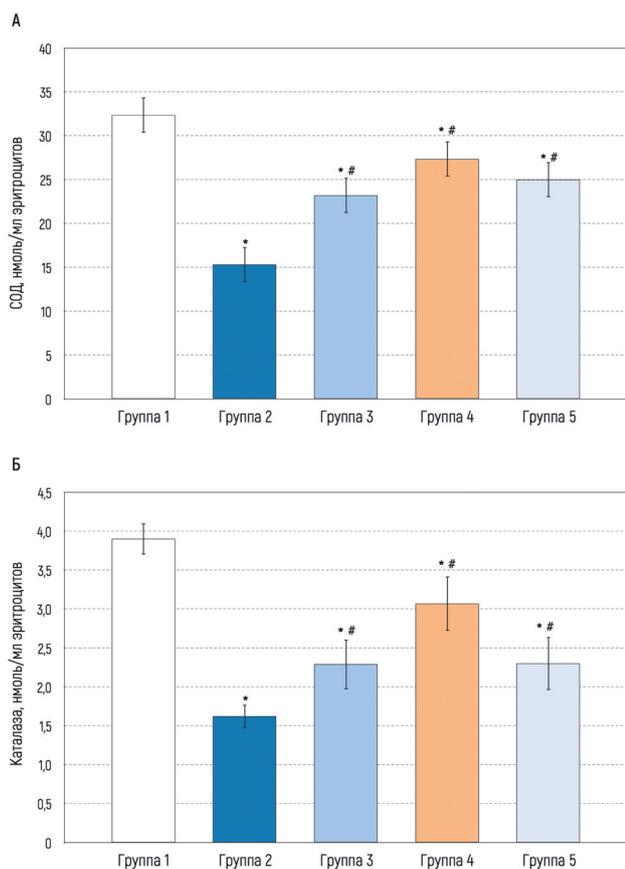
* $p < 0.05$ compared with intact control (group 1); # $p < 0.05$ compared with the induced DM, without DPP-4 inhibitors were not used (group 2); * $p < 0.05$ compared with group 3.

чески значимому повышению уровня нитрита, в сравнении с интактным контролем (группа 1) и группой с индуцированным СД 2, не получавшей ингибиторов ДПП-4 (группа 2). Наиболее высокие уровни нитрита наблюдались в группе 4, которой вводили саксаглиптин (см. рис. 2А). Однако эти значения не были статистически значимо выше, чем в группах крыс с применением ситаглиптина (группа 3) и вилдаглиптина (группа 5).

Индукция СД 2 у животных приводила также к значительному увеличению содержания в плазме крови O_2^- по сравнению с интактным контролем (рис. 2Б). Трехнедельное раздельное введение ингибиторов ДПП-4 в 3, 4 и 5-й группах животных снижало содержание O_2^- в плазме крови по сравнению с группой индуцированного СД, не получавшей ДПП-4 (группа 2). При этом наиболее выраженным

оно было в группе 5, в которой применялся вилдаглиптин. В отличие от этого ситаглиптин (группа 3) обуславливал наименьшее влияние. Хотя все ингибиторы ДПП-4 снижали содержание O_2^- , ни один из препаратов не подавлял процесс генерации кислородных радикалов до его уровня у интактных животных (группа 1).

Индукция СД 2 привела также к увеличению содержания в плазме крови уровня H_2O_2 по сравнению с таковым у интактных животных (рис. 2В). Трехнедельное внутрибрюшинное введение крысам с СД 2 препаратов из группы ингибиторов ДПП-4 обуславливало значительное снижение уровня H_2O_2 . При этом обнаружены существенные различия выраженности эффектов саксаглиптина в сравнении с ситаглиптином и вилдаглиптином: саксаглиптин наименее эффективен (группа 3) и обес-



печивал наименьшее снижение содержания H_2O_2 в плазме крови животных с СД 2. Ни один из трех ингибиторов ДПП-4 не снижал также уровень H_2O_2 до значений в контрольной группе у интактных крыс.

Значения ИПОЛ (отражающего содержание в плазме крови МДА) между группами существенно не отличались как при индукции СД 2, так и в условиях применения у животных с СД 2 ингибиторов ДПП-4 (рис. 2Г).

Влияние трехнедельного раздельного применения ингибиторов ДПП-4 на активность и содержание факторов антиоксидантной защиты

Индукция СД 2 у крыс сочеталась со значительным снижением активности СОД в сравнении с контрольной группой животных (рис. 3А). Раздельное применение в течение 3 нед всех трех ингибиторов ДПП-4 приводило к статистически значимому повышению активности фермента (см. рис. 2А). Однако, несмотря на использование указанных препаратов, активность СОД в 3–4-й группах животных была значительно ниже, чем в группе 1 (интактный контроль). При сравнении эффектов различных ингибиторов ДПП-4 обнаружено, что в условиях применения ситаглиптина (группа 4) наблюдался наибольший уровень активности СОД. Саксаглиптин (группа 3) и вилдаглиптин (группа 5) оказывали такое влияние в несколько меньшей степени (рис. 3А).

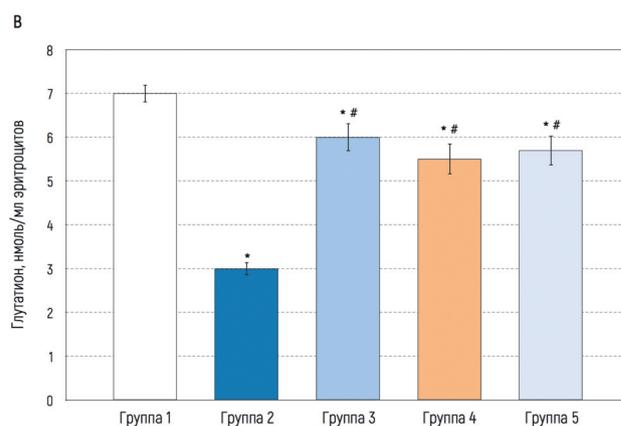


РИС. 3. Влияние ингибиторов ДПП-4 на активность антиоксидантных ферментов – СОД и каталазы, а также содержание глутатиона в лизате эритроцитов ($M \pm m$) у крыс различных серий (нмоль/мл эритроцитов): А – СОД; Б – каталаза; В – глутатион.

Примечание. Группа 1 – интактный контроль, группа 2 – индуцированный СД без применения ДПП-4, группа 3 – индуцированный СД + саксаглиптин, группа 4 – индуцированный СД + ситаглиптин, группа 5 – индуцированный СД + вилдаглиптин.

* $p < 0,05$ в сравнении с интактным контролем (группа 1); # $p < 0,05$ в сравнении с группой с индуцированным СД без применения ингибиторов ДПП-4 (группа 2).

FIGURE 3. The effect of DPP-4 inhibitors on the activity of antioxidant enzymes: SOD and catalase and the level of glutathione in lysate of red blood cells ($M \pm m$) of rats in different groups (nmol/ml of red blood cells): А – SOD; В – Catalase, С – Glutathione.

Notes. Group 1 – intact control, group 2 – induced DM without DPP-4 inhibitors, group 3 – induced DM + saxagliptin, group 4 – induced DM + sitagliptin, group 5 – induced DM + vildagliptin.

* $p < 0.05$ compared with intact control (group 1); # $p < 0.05$ compared with the induced DM, in without DPP-4 inhibitors were not used (group 2).

Практически идентичная тенденция наблюдалась в отношении активности каталазы (рис. 3Б). Индукция СД 2 сопровождалась ее снижением, а применение каждого из ингибиторов ДПП-4 повышало активность каталазы, наиболее значимо в группе 4 (саксаглиптин). При этом, как и в случае с СОД, активность каталазы не увеличивалась до уровня у интактных животных.

Индукция СД 2 сочеталась также со снижением содержания в лизате эритроцитов вещества с антиоксидантной активностью – глутатиона (рис. 3В). Трехнедельное применение препаратов из группы ингибиторов ДПП-4 привело к статистически значимому восстановлению ранее сниженной у крыс с СД концентрации глутатиона. Однако, как и в случаях с антиоксидантными ферментами (СОД и каталазой), содержание глутатиона было все-таки ниже, чем в группе интактных крыс. Уровни глутатиона между группами животных с СД 2 при раз-

дельном применении ингибиторов ДПП-4 существенно не отличались.

ОБСУЖДЕНИЕ

СД 2 является сложной многофакторной формой патологии. Она характеризуется нарушением всех видов обмена веществ, что приводит к повышению в крови уровня глюкозы, липидов и дислипидемии. Хроническое действие в организме повышенных уровней глюкозы и липидов запускает различные пути активации секреции инсулина β -клетками поджелудочной железы, увеличивает резистентность к инсулину тканей и органов, снижает эффективность использования ими глюкозы и избыточную продукцию глюкозы в печени [10]. Кроме того, СД 2 создает условия для развития большого числа осложнений, включая артериальную гипертензию и другие формы сердечно-сосудистых заболеваний. В связи с этим важно знать молекулярные механизмы возникновения СД, что будет способствовать как разработке направленного и эффективного лечения этой сложной формы патологии, так и предотвращению возможных, в том числе фатальных, осложнений [11].

Результаты клинических исследований показали, что системный окислительный стресс тесно связан с развитием СД 2. Повышенное содержание таких маркеров повреждения тканей, как окисленные молекулы ДНК, модифицированный 4-гидрокси-2-ноненалем-белок, гидропероксиды, 8-гидрокси-десоксигуанин и 8-эпи-простагландин F₂ α закономерно выявляются у пациентов с СД 2 в плазме крови и тканях, в том числе в поджелудочной железе [12].

Модифицированный 4-гидрокси-2-ноненалем-белок образуется в процессе перекисного окисления липидов и, таким образом, считается биомаркером окислительного стресса, а также одним из наиболее важных реакционно-способных альдегидов. Эта молекула участвует в многочисленных физиологических процессах как неклассический вторичный мессенджер. Активация модифицированного 4-гидрокси-2-ноненалем-белка может привести либо к выживанию клеток, либо к смерти, что зависит от типа клеток. Кроме того, модифицированный 4-гидрокси-2-ноненалем-белок играет роль в патогенезе ряда заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, сердечная недостаточность, атеросклероз, рак, диабет и острое повреждение легких [13].

Экспериментальные исследования доказали, что общий антиоксидантный потенциал при СД 2 значительно снижен, а содержание пероксидов и других маркеров окислительного стресса существенно выше нормы [14].

Результаты нашего исследования выявили факт повышения у крыс с индуцированным СД 2 уровнем O₂⁻ и H₂O₂. Известно, что АФК играют пусковую роль в инициации избыточного окислительного

стресса. Показано, что у крыс с СД 2 наблюдается существенное увеличение содержания H₂O₂ в сочетании со значительным снижением активности СОД, фермента, представляющего собой первую линию защиты от неконтролируемой генерации АФК. Эти результаты свидетельствуют о закономерном развитии окислительного стресса в условиях индуцированного СД 2. Нами выявлен также факт снижения активности каталазы, преобразующей H₂O₂ в воду и молекулярный кислород. Этот фермент представляет собой другую линию защиты от избытка свободных радикалов у крыс с СД 2.

Известно также, что снижение активности СОД и последующее накопление избытка O₂⁻ сопровождаются его связыванием с окисью азота и образованием высокоцитотоксичного пероксинитрита. Результаты нашего исследования подтверждают этот факт, поскольку у крыс с индуцированным СД 2 зарегистрированы более низкие уровни нитритов. Они, как известно, являются косвенной мерой снижения содержания монооксида азота, обладающего сосудорасширяющим и антиагрегантным свойствами. Показано, что нарастание генерации АФК и снижение уровня NO может приводить к чрезмерной активации перекисного окисления липидов [15]. К. Murakami и соавт. выявили, что для пациентов с СД 2 характерны пониженное содержание восстановленного глутатиона в эритроцитах при одновременно повышенном уровне окисленного глутатиона [16]. В нашем исследовании установлен факт снижения уровня восстановленной формы глутатиона у крыс с индуцированным СД 2.

Известно, что у пациентов с СД 2 терапия, как правило, начинается с перорально применяемого гипогликемического препарата метформина, являющегося производным бигуанидина.

Однако также хорошо известно, что со временем эффективность этого препарата снижается. Показано, что процент пациентов с успешным контролем ГПК со временем снижается. Обычно после 3 лет лечения метформином примерно у 50% пациентов еще удается регулировать уровень ГПК, но после 9 лет лечения число таких пациентов снижается до 25%. С учетом этого факта очевидно, что необходимо проведение комбинированной терапии. Чаще всего в последнее десятилетие дополнительно применяют препараты из группы производных сульфонилмочевины. Однако существенным недостатком этой группы препаратов является ингибирование ими АТФ-зависимых калиевых каналов, что может вызывать расстройства ритма и сократительной функции сердца и тем самым увеличивать риск развития у пациентов с СД 2 сердечно-сосудистых осложнений [17]. В связи с этим весьма важно разработать стратегию лечения пациентов с СД 2, которое, нормализуя уровень ГПК, одновременно препятствовало бы развитию его осложнений.

Как показано в настоящей работе, СД 2 индуцирует у крыс развитие чрезмерно выраженного, по сравнению с группой контрольных животных, окислительного стресса в сочетании со значительным подавлением эффективности системы антиоксидантной защиты организма, что является одним из механизмов дальнейшего потенцирования осложнений.

Использование лекарственных средств, которые в дополнение к гипогликемизирующему действию будут способствовать и подавлению окислительного стресса, обеспечит снижение степени повреждения органов и тканей, а также риска развития осложнений у пациентов с СД. В нашем исследовании мы использовали ингибиторы активности ДПП-4. Эти препараты, как известно, способствуют повышению уровня кишечных гормонов – инкретинов: глюкагоноподобного пептида-1 и желудочного ингибирующего полипептида.

В настоящей работе помимо других решалась и задача по выяснению возможности использования ингибиторов ДПП-4 (ситаглиптина, саксаглиптина и вилдаглиптина) у крыс с СД 2 для снижения интенсивности системного окислительного стресса с учетом влияния указанных препаратов [18] на содержание прооксидантов и факторов антиоксидантной защиты. Выявлено, что все использованные нами ингибиторы ДПП-4 существенно изменяли показатели окислительного стресса, хотя выраженность их эффектов была различной. Из трех препаратов этой группы вилдаглиптин оказывал наиболее сильное ингибирующее влияние на генерацию АФК. Трехнедельного внутрибрюшинного применения этого препарата у крыс с СД 2 оказалось достаточным для достижения статистически значимого снижения уровней O_2^- и H_2O_2 , приблизив их к значениям в контрольной группе крыс. Этот эффект можно объяснить активацией первой и второй линий антиоксидантной защиты: повышением активности и СОД, и каталазы. I. Sherif и соавт. показали, что вилдаглиптин может увеличивать активность каталазы печени у крыс с ее ишемическо-реперфузионным повреждением [19]. Применение двух других препаратов также приводило к статистически значимому снижению количества АФК и повышению активности СОД и каталазы. Эти результаты согласуются с данными других исследований, которые изучали антиоксидантный потенциал таких же препаратов [20]. Помимо влияния на активность СОД и каталазы все три препарата увеличили также концентрацию глутатиона, обладающего антиоксидантным действием.

Из всех трех препаратов ситаглиптин показал наиболее выраженный потенцирующий эффект на факторы антиоксидантной защиты. Такой эффект ситаглиптина можно объяснить его принадлежностью к группе непептидомиметиков. Эти препараты создают нековалентные связи с каталитическим доменом ферментов ДПП-4, что приводит к

их быстрому ингибированию [21]. Кроме того, ситаглиптин, как один из наиболее эффективных препаратов из группы ингибиторов ДПП-4, успешно предотвращает деградацию инсулинотропных инкретинов, прежде всего глюкагоноподобного пептида-1. Таким образом, достаточная концентрация глюкагоноподобного пептида-1 вызывает ингибирование активности фермента NADPH-оксидазы, тем самым снижая выработку активных форм кислорода, и таким образом препятствует окислительному повреждению клеток.

Антиоксидантный эффект ситаглиптина объясняется тем, что этот препарат у крыс вызывает увеличение экспрессии информационной РНК основных антиоксидантных ферментов защиты – СОД, каталазы, глутатионредуктазы, глутатионпероксидазы и, соответственно, приводит к увеличению их активности [22].

R. Refaat и соавт. на крысах с СД 2 выявили также, что применение вилдаглиптина приводит к увеличению содержания восстановленного глутатиона в печени [23]. Аналогичный факт влияния ситаглиптина на содержание восстановленного глутатиона в печени продемонстрирован D. El-Kashef и соавт. [20], а также саксаглиптина – на уровень восстановленного глутатиона в почках [24].

Все три препарата приводили также к увеличению, синтеза NO_2^- , особенно у крыс, страдающих СД 2, в сравнении с контрольными. Данный факт важен, поскольку он свидетельствует о большом потенциале действия этих препаратов как вазодилататоров. Это может оказывать защитный эффект в отношении кардиоваскулярной системы и благодаря этому – других тканей и органов пациентов с СД. Известно, что в отличие от этого большое количество антидиабетических средств оказывает негативное влияние на состояние сердечно-сосудистой системы [17].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе показано, что ингибиторы ДПП-4 в существенной мере подавляют системный окислительный стресс у крыс с индуцированным СД 2. Это достигается благодаря торможению избыточной генерации прооксидантов (O_2^- и H_2O_2) и протективному действию в отношении факторов системы антиоксидантной защиты (активности СОД, каталазы и содержания глутатиона).

В наибольшей мере вилдаглиптин препятствует образованию прооксидантов, а ситаглиптин оказывает наибольший защитный эффект за счет активации антиоксидантов. Кроме того, все три препарата обладают потенциальным вазодилатирующим действием за счет увеличения продукции NO_2^- .

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests. The authors declare that there is no conflict of interests.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Дедов И.И. Сахарный диабет типа 2: от теории к практике. М.: МИА, 2016.
2. Дедов И.И., Шестакова М.В., Викулова О.К. Эпидемиология сахарного диабета в Российской Федерации: клинико-статистический анализ по данным Федерального регистра сахарного диабета. Сахарный диабет. 2017; 20 (1): 13–41. DOI: 10.14341/DM8664
3. Filippas-Ntekouan S, Filippatos TD, Elisaf MS. SGLT2 inhibitors: are they safe? Postgrad Med 2018; 130 (1): 72–82. DOI: 10.1080/00325481.2018.1394152. PMID: 29039237.
4. Дедов И.И., Шестакова М.В. Осложнения сахарного диабета. Лечение и профилактика. М.: МИА, 2017.
5. Румянцева С.А., Силина Е.В., Орлова А.С. и др. Гипергликемия и свободнорадикальный дисбаланс как прогностические маркеры острого нарушения мозгового кровообращения. Анналы клинической и экспериментальной неврологии. 2012; 6 (4): 26–9.
6. Sani NF, Belani LK, Sin CP et al. Effect of the combination of gelam honey and ginger on oxidative stress and metabolic profile in streptozotocin-induced diabetic Sprague-Dawley rats. Biomed Res Int 2014; 160695. DOI: 10.1155/2014/160695. PMID: 24822178.
7. Gupta V, Kalra S. Choosing a gliptin. Indian J Endocrinol Metab 2011; 15: 298–308. DOI: 10.4103/2230-8210.85583. PMID: 22029001.
8. Tatosian DA, Guo Y, Schaeffer AK et al. Dipeptidyl peptidase-4 inhibition in patients with type 2 diabetes treated with saxagliptin, sitagliptin, or vildagliptin. Diabetes Ther 2013; 4 (2): 431–42. DOI: 10.1007/s13300-013-0045-8. PMID: 24163113.
9. Jakovljevic V, Milic P, Bradic J et al. Standardized Aronia melanocarpa Extract as Novel Supplement against Metabolic Syndrome: A Rat Model. Int J Mol Sci 2018; 20 (1): 6. DOI: 10.3390/ijms20010006. PMID: 30577476.
10. Hulman A, Vistsen D, Glümer C et al. Glucose patterns during an oral glucose tolerance test and associations with future diabetes, cardiovascular disease and all-cause mortality rate. Diabetologia 2018; 61 (1): 101–7. DOI: 10.1007/s00125-017-4468-z. PMID: 28983719.
11. Zheng Y, Ley S, Hu F. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. Nature Reviews Endocrinology 2018; 14 (2): 88–98. DOI: 10.1038/nrendo.2017.151. PMID: 29219149.
12. Rehman K, Akash MSH. Mechanism of Generation of Oxidative Stress and Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus How Are They Interlinked? J Cell Biochem 2017; 118 (11): 3577–85. DOI: 10.1002/jcb.26097
13. Breitzig M, Bhimineni C, Lockey R, Kolliputi N. 4-Hydroxy-2-nonenal: a critical target in oxidative stress? Am J Physiol Cell Physiol 2016; 311 (4): C537–C543. DOI: 10.1152/ajpcell.00101.2016
14. Nowotny K, Jung T, Höhn A et al. Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. Biomolecules 2015; 5 (1): 194–222. DOI: 10.3390/biom5010194
1. Dedov I.I. Saharnyj diabet tipa 2. Ot teorij k praktike / Type 2 diabetes mellitus: from theory to practice. Moscow: MIA, 2016. [in Russian]
2. Dedov I.I., Shestakova M.V., Vikulova O.K. Epidemiologija sakharnogo diabeta v Rossijskoj Federatsii: kliniko-statisticheskij analiz po dannym Federal'nogo registra sakharnogo diabeta / Epidemiology of diabetes mellitus in Russian Federation: clinical and statistical report according to the federal diabetes registry. Diabetes Mellitus. 2017; 20 (1): 13–41. DOI: 10.14341/DM8664 [in Russian]
3. Filippas-Ntekouan S, Filippatos TD, Elisaf MS. SGLT2 inhibitors: are they safe? Postgrad Med 2018; 130 (1): 72–82. DOI: 10.1080/00325481.2018.1394152. PMID: 29039237.
4. Dedov I.I., Shestakova M.V. Oslozhnenija sakharnogo diabeta. Lechenie i profilaktika / Complications of diabetes. Treatment and prevention. Moscow: MIA, 2017. [in Russian]
5. Rumyantseva S.A., Silina E.V., Orlova A.S. et al. Giperglikemiya i svobodnoradikal'nyy disbalans kak prognosticheskie markery ostrogo narusheniya mozgovogo krovoobrashcheniya / Hyperglycemia and free radical imbalance as prognostic factors of stroke. Annaly klinicheskoy i eksperimental'noj nevrologii. 2012; 6 (4): 26–9. [in Russian]
6. Sani NF, Belani LK, Sin CP et al. Effect of the combination of gelam honey and ginger on oxidative stress and metabolic profile in streptozotocin-induced diabetic Sprague-Dawley rats. Biomed Res Int 2014; 160695. DOI: 10.1155/2014/160695. PMID: 24822178.
7. Gupta V, Kalra S. Choosing a gliptin. Indian J Endocrinol Metab 2011; 15: 298–308. DOI: 10.4103/2230-8210.85583. PMID: 22029001.
8. Tatosian DA, Guo Y, Schaeffer AK et al. Dipeptidyl peptidase-4 inhibition in patients with type 2 diabetes treated with saxagliptin, sitagliptin, or vildagliptin. Diabetes Ther 2013; 4 (2): 431–42. DOI: 10.1007/s13300-013-0045-8. PMID: 24163113.
9. Jakovljevic V, Milic P, Bradic J et al. Standardized Aronia melanocarpa Extract as Novel Supplement against Metabolic Syndrome: A Rat Model. Int J Mol Sci 2018; 20 (1): 6. DOI: 10.3390/ijms20010006. PMID: 30577476.
10. Hulman A, Vistsen D, Glümer C et al. Glucose patterns during an oral glucose tolerance test and associations with future diabetes, cardiovascular disease and all-cause mortality rate. Diabetologia 2018; 61 (1): 101–7. DOI: 10.1007/s00125-017-4468-z. PMID: 28983719.
11. Zheng Y, Ley S, Hu F. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. Nature Reviews Endocrinology 2018; 14 (2): 88–98. DOI: 10.1038/nrendo.2017.151. PMID: 29219149.
12. Rehman K, Akash MSH. Mechanism of Generation of Oxidative Stress and Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus How Are They Interlinked? J Cell Biochem 2017; 118 (11): 3577–85. DOI: 10.1002/jcb.26097
13. Breitzig M, Bhimineni C, Lockey R, Kolliputi N. 4-Hydroxy-2-nonenal: a critical target in oxidative stress? Am J Physiol Cell Physiol 2016; 311 (4): C537–C543. DOI: 10.1152/ajpcell.00101.2016
14. Nowotny K, Jung T, Höhn A et al. Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. Biomolecules 2015; 5 (1): 194–222. DOI: 10.3390/biom5010194

15. *Perez-Matute P, Zulet MA, Mart'nez JA.* Reactive species and diabetes: counteracting oxidative stress to improve health. *Curr Opin Pharmacol* 2009; 9 (6): 771–9. DOI: 10.1016/j.coph.2009.08.005
16. *Murakami K, Kondo T, Ohtsuka Y et al.* Impairment of glutathione metabolism in erythrocytes from patients with diabetes mellitus. *Metabolism* 1989; 38 (8): 753–8. DOI: 10.1016/0026-0495(89)90061-9. PMID: 2569661.
17. *Kottenberg E, Thielmann M, Kleinbongard P et al.* Myocardial protection by remote ischaemic pre-conditioning is abolished in sulphonylurea-treated diabetics undergoing coronary revascularisation. *Acta Anaesthesiol Scand* 2014; 58 (4): 453–62. DOI: 10.1111/aas.12278. PMID: 24548338.
18. *Tatosian DA, Guo Y, Schaeffer AK et al.* Dipeptidyl peptidase-4 inhibition in patients with type 2 diabetes treated with saxagliptin, sitagliptin, or vildagliptin. *Diabetes Therapy* 2013; 4 (2): 431–42. DOI: 10.1007/s13300-013-0045-8
19. *Sherif IO, Al-Shaalan NH.* Vildagliptin Attenuates Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury via the TLR4/NF- B Signaling Pathway. *Oxid Med Cell Longev* 2018; 3509091. DOI: 10.1155/2018/3509091. PMID: 30405876.
20. *El-Kashef DH, Serrya MS.* Sitagliptin ameliorates thioacetamide-induced acuteliver injury via modulating TLR4/NF-KB signaling pathway in mice. *Life Sci* 2019; 228: 266–73. DOI: 10.1016/j.lfs.2019.05.019
21. *Sangle G, Patil M, Deshmukh N et al.* Evaluation of pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters following single dose of sitagliptin in healthy Indian males. *Eur J Clin Pharmacol* 2018; 74 (5): 561–9. DOI: 10.1007/s00228-018-2433-5
22. *Trocha M, Krzystek-Korpacka M, Merwid-L d A et al.* Sitagliptin-Dependent Differences in the Intensity of Oxidative Stress in Rat Livers Subjected to Ischemia and Reperfusion. *Oxid Med Cell Longev* 2019 Oct 31: 2738605. DOI: 2019:2738605. PMID: 31781329.
23. *Refaat R, Sakr A, Salama M, El Sarha A.* Combination of Vildagliptin and Pioglitazone in Experimental Type 2 Diabetes in Male Rats. *Drug Dev Res* 2016; 77 (6): 300–9. DOI: 10.1002/ddr.21324
24. *Helal MG, Zaki MMAF, Said E.* Nephroprotective effect of saxagliptin against gentamicin-induced nephrotoxicity, emphasis on anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-apoptic effects. *Life Sci* 2018; 208: 64–71. DOI: 10.1016/j.lfs.2018.07.021
15. *Perez-Matute P, Zulet MA, Mart'nez JA.* Reactive species and diabetes: counteracting oxidative stress to improve health. *Curr Opin Pharmacol* 2009; 9 (6): 771–9. DOI: 10.1016/j.coph.2009.08.005
16. *Murakami K, Kondo T, Ohtsuka Y et al.* Impairment of glutathione metabolism in erythrocytes from patients with diabetes mellitus. *Metabolism* 1989; 38 (8): 753–8. DOI: 10.1016/0026-0495(89)90061-9. PMID: 2569661.
17. *Kottenberg E, Thielmann M, Kleinbongard P et al.* Myocardial protection by remote ischaemic pre-conditioning is abolished in sulphonylurea-treated diabetics undergoing coronary revascularisation. *Acta Anaesthesiol Scand* 2014; 58 (4): 453–62. DOI: 10.1111/aas.12278. PMID: 24548338.
18. *Tatosian DA, Guo Y, Schaeffer AK et al.* Dipeptidyl peptidase-4 inhibition in patients with type 2 diabetes treated with saxagliptin, sitagliptin, or vildagliptin. *Diabetes Therapy* 2013; 4 (2): 431–42. DOI: 10.1007/s13300-013-0045-8
19. *Sherif IO, Al-Shaalan NH.* Vildagliptin Attenuates Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury via the TLR4/NF- B Signaling Pathway. *Oxid Med Cell Longev* 2018; 3509091. DOI: 10.1155/2018/3509091. PMID: 30405876.
20. *El-Kashef DH, Serrya MS.* Sitagliptin ameliorates thioacetamide-induced acuteliver injury via modulating TLR4/NF-KB signaling pathway in mice. *Life Sci* 2019; 228: 266–73. DOI: 10.1016/j.lfs.2019.05.019
21. *Sangle G, Patil M, Deshmukh N et al.* Evaluation of pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters following single dose of sitagliptin in healthy Indian males. *Eur J Clin Pharmacol* 2018; 74 (5): 561–9. DOI: 10.1007/s00228-018-2433-5
22. *Trocha M, Krzystek-Korpacka M, Merwid-L d A et al.* Sitagliptin-Dependent Differences in the Intensity of Oxidative Stress in Rat Livers Subjected to Ischemia and Reperfusion. *Oxid Med Cell Longev* 2019 Oct 31: 2738605. DOI: 2019:2738605. PMID: 31781329.
23. *Refaat R, Sakr A, Salama M, El Sarha A.* Combination of Vildagliptin and Pioglitazone in Experimental Type 2 Diabetes in Male Rats. *Drug Dev Res* 2016; 77 (6): 300–9. DOI: 10.1002/ddr.21324
24. *Helal MG, Zaki MMAF, Said E.* Nephroprotective effect of saxagliptin against gentamicin-induced nephrotoxicity, emphasis on anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-apoptic effects. *Life Sci* 2018; 208: 64–71. DOI: 10.1016/j.lfs.2018.07.021

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Болевич Стефани Сергеевна, ассистент кафедры патофизиологии ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» (Сеченовский Университет). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5794-9263>

Литвицкий Петр Францевич, чл.-кор. РАН, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой патофизиологии ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» (Сеченовский Университет). ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0151-9114>

Яковлевич Владимир, д-р мед. наук, профессор, декан факультета медицинских наук Университета г. Крагуевац (Сербия). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0071-8376>

Болевич Сергей Бранкович, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой патологии человека ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» (Сеченовский Университет). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1574-477X>

Stefani S. Bolevich, Assistant Professor at the Pathophysiology Department, Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5794-9263>

Peter F. Litvitsky, Doctor of Medical Science, Professor, Corresponding member of RAS, Head of the Pathophysiology Department, Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University). ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0151-9114>

Vladimir Jakovljevic, MD, Professor, Dean of the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac (Serbia). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0071-8376>

Sergey B. Bolevich, Doctor of Medical Science, Professor, Head of the Human Pathology Department, Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1574-477X>