

# Митохондриальные нарушения при нервно-мышечной патологии

С.В. Котов, О.П. Сидорова, Е.В. Бородатая

Кафедра неврологии ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского»; Россия, 129110 Москва, ул. Щепкина, 61/2, корп. 10

Контакты: Ольга Петровна Сидорова [sidorovaop2008@rambler.ru](mailto:sidorovaop2008@rambler.ru)

**Введение.** С появлением новых препаратов — аналогов метаболитов митохондрий актуальным становится широкое введение в практику методов исследования для оценки функции митохондрий у больных с неврологической патологией и другими заболеваниями.

**Цель исследования** — определить изменение внутриклеточной активности митохондриальных ферментов (сукцинатдегидрогеназы,  $\alpha$ -глицерофосфатдегидрогеназы, глутаматдегидрогеназы, лактатдегидрогеназы) при нервно-мышечных заболеваниях.

**Материалы и методы.** Обследовали 74 больных с нервно-мышечными заболеваниями. Оценивали активность 4 ферментов митохондрий, участвующих в углеводном обмене (лактатдегидрогеназа), обмене аминокислот (глутаматдегидрогеназа), жирных кислот ( $\alpha$ -глицерофосфатдегидрогеназа) и II комплексе дыхательной цепи митохондрий (сукцинатдегидрогеназа). Для цитохимического исследования активности митохондриальных ферментов в лимфоцитах периферической крови использовали метод, предложенный A.G.E. Pearse в модификации Р.П. Нарциссова.

**Результаты.** Наибольшие изменения выявлены при миотонической дистрофии: статистически достоверное снижение среднего значения активности всех исследуемых ферментов ( $p < 0,05$ ). При наследственной моторно-сенсорной нейропатии I типа снижена активность сукцинатдегидрогеназы и глутаматдегидрогеназы ( $p < 0,05$ ), при II типе — есть отклонения показателей активности митохондриальных ферментов, более выраженные по сравнению с I типом, но статистически не значимо ( $p > 0,05$ ). У больных миастенией было отмечено снижение активности  $\alpha$ -глицерофосфатдегидрогеназы и глутаматдегидрогеназы ( $p < 0,05$ ). Средние значения показателей активности сукцинатдегидрогеназы и лактатдегидрогеназы были также снижены ( $p > 0,05$ ). При миопатии Ландузи—Дежерина активность сукцинатдегидрогеназы,  $\alpha$ -глицерофосфатдегидрогеназы и глутаматдегидрогеназы были снижены, из них только для  $\alpha$ -глицерофосфатдегидрогеназы  $p < 0,05$ . При анализе каждого случая в группах больных с исследуемой патологией было показано, что кроме пациентов с миотонической дистрофией, при которой у всех больных снижалась активность сукцинатдегидрогеназы,  $\alpha$ -глицерофосфатдегидрогеназы и глутаматдегидрогеназы, в остальных случаях у части больных исследуемая активность ферментов не изменялась.

**Заключение.** Существуют методы исследования этих метаболитов в плазме крови. Также исследуют активность митохондриальных ферментов. При нервно-мышечных заболеваниях имеются нарушения работы митохондрий. Следовательно, надо рассматривать таких пациентов и как «метаболических больных» и назначать им назначать метаболическую, антиоксидантную терапию.

**Ключевые слова:** нервно-мышечные болезни, митохондрия, мышечная дистрофия, миопатия, наследственная моторно-сенсорная невропатия, миастения, сукцинатдегидрогеназа,  $\alpha$ -глицерофосфатдегидрогеназа, глутаматдегидрогеназа, лактатдегидрогеназа

**Для цитирования:** Котов С.В., Сидорова О.П., Бородатая Е.В. Митохондриальные нарушения при нервно-мышечной патологии. Нервно-мышечные болезни 2019;9(3):22–31.

DOI: 10.17650/2222-8721-2019-9-3-22-31

## Mitochondrial disorders in neuromuscular pathology

S. V. Kotov, O. P. Sidorova, E. V. Borodataya

Department of Neurology, Moscow Regional Clinical Research Institute named M. F. Vladimirov;  
Build. 10, 61/2 Schepkina St., Moscow 129110, Russia

**Introduction.** With the advent of new drugs — analogues of mitochondrial metabolites, the widespread introduction into practice of research methods for assessing the function of mitochondria in patients with neurological pathology and other diseases becomes relevant.

**Study aim.** To determine the change in the intracellular activity of mitochondrial enzymes (succinate dehydrogenase,  $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase, glutamate dehydrogenase, lactate dehydrogenase) in case of neuromuscular diseases.

**Materials and methods.** We examined 74 patients with neuromuscular diseases. The activity of 4 mitochondrial enzymes involved in carbohydrate metabolism (lactate dehydrogenase), amino acid metabolism (glutamate dehydrogenase), fatty acids ( $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase), and mitochondrial respiratory chain complex II (succinate dehydrogenase) was evaluated. For a cytochemical study of the activity of mitochondrial enzymes in peripheral blood lymphocytes, the method proposed by A.G.E. Pearse as modified by R. P. Narcissos.

**Results.** The greatest changes were revealed in cases with myotonic dystrophy: statistically significant decreases in the average activity value of all studied enzymes ( $p < 0.05$ ). In cases with hereditary motor-sensory neuropathy of type I the activity of succinate dehydrogenase and glutamate dehydrogenase is reduced ( $p < 0.05$ ), in cases with type II there are deviations in the activity indicators of mitochondrial enzymes,

more pronounced compared with type I, but not statistically significant ( $p > 0.05$ ). In patients with myasthenia gravis, a decrease in the activity of  $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase and glutamate dehydrogenase ( $p < 0.05$ ) was noted. Average values of succinate dehydrogenase and lactate dehydrogenase activity indicators were also reduced ( $p > 0.05$ ). In cases with Landusi-Dejerine myopathy the activity of succinate dehydrogenase,  $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase and glutamate dehydrogenase were reduced, of which only for  $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase  $p < 0.05$ . In the analysis of each case in groups of patients with the studied pathology, it was shown that in addition to patients with myotonic dystrophy, in which all patients decreased the activity of succinate dehydrogenase,  $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase and glutamate dehydrogenase, in other cases, in some patients, the studied enzyme activity did not change.

**Conclusion.** There are methods for studying these metabolites in plasma. The activity of mitochondrial enzymes is also examined. In cases with neuromuscular diseases, there are violations of the mitochondria. Therefore, it is necessary to consider such patients as metabolic patients and prescribe metabolic, antioxidant therapy to them.

**Key words:** neuromuscular diseases, mitochondria, muscular dystrophy, myopathy, hereditary motor-sensory neuropathy, myasthenia gravis, succinate dehydrogenase,  $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase, glutamate dehydrogenase, lactate dehydrogenase

**For citation:** Kotov S.V., Sidorova O.P., Borodataya E.V. Mitochondrial disorders in neuromuscular pathology. *Nervno-myshechnye bolezni* = Neuromuscular diseases 2019;9(3):22–31.

## Введение

В последнее время в связи с появлением новых препаратов, улучшающих функцию митохондрий, становится актуальным исследование патологии митохондрий при неврологических заболеваниях, в том числе наследственных [1–9]. Наряду с заболеваниями, наследуемых по материнскому типу, когда измененный генетический материал передается от матери с митохондриями, нарушение их функции выявляют и при старении, наследственные неврологических заболеваний, наследуемых другими способами: атаксия Фридрейха, мышечная дистрофия Дюшенна, спинальные мышечные атрофии, наследственные моторно-сенсорные невропатии (НМСН) [10–13].

Митохондрии являются энергетическими станциями клеток. В них протекает огромное количество процессов. Можно выделить 4 основных типа обмена:

- 1) перенос электронов в цикле дыхательной цепи;
- 2) жировой обмен, в котором участвует карнитин;
- 3) аминокислотный обмен;
- 4) углеводный обмен.

Существует 5 комплексов митохондриальной электронной транспортной цепи [14]:

- Комплекс I (Восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотида (НАДН): убихинон-оксидоредуктаза).
- Комплекс II (сукцинат (янтарная кислота): убихинон оксидоредуктаза).
- Комплекс III (убихинол: ферроцитохром с-оксидоредуктаза или цитохром-bc-комплекс).
- Комплекс IV (ферроцитохром с: кислород оксидоредуктаза или цитохром с-оксидаза).
- Комплекс V (синтез аденозинтрифосфата).

Оценка функции митохондрий проводится различными методами. V.N. Sure и соавт. предложили метод измерения дыхательных параметров митохондрий в свежее выделенных микрососудах из головного мозга мыши *ex vivo* с использованием анализатора Seahorse XFе24 [15]. Возможны исследование цитохрома С,

уровня лактата [16], определение активности митохондриальных ферментов (глутаматдегидрогеназы (ГДГ)) [17], изучение I, II, III, IV комплексов дыхательной цепи митохондрий, потребления кислорода, трансмембранного потенциала, синтеза аденозинтрифосфата [18]. Используют колориметрический анализ оксидоредуктазы в дыхательной цепи митохондрий [19], изучают митохондриальный мембранный потенциал [20]. В фибробластах возможно определение активности ферментов дыхательной цепи (сукцинат-коэнзим-Q-редуктазы, II комплекса, уровня коэнзима  $Q_{10}$ , ферментов биосинтеза CoQ10, а именно COQ5 и COQ7) [21]. Также применяют цитохимический метод исследования активности митохондриальных ферментов в лимфоцитах периферической крови [22], который позволяет определить количество окрашенных гранул (продукт реакции дегидрогеназ митохондрий) в клетках, характеристики этих гранул, провести исследование цитоморфоденситометрических показателей митохондриальной активности лимфоцитов (активность объединенных митохондрий (кластеров), общий продукт реакции в отдельных митохондриях и т.д. С помощью этого метода можно определять среднюю активность ферментов, коэффициент асимметрии, коэффициент вариации и другие показатели. Преимущество метода в том, что активность фермента исследуется внутриклеточно.

При оценке активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ) возможно применение спектрофотометрического метода [23]. Для оценки активности ГДГ применяют количественный гистохимический метод [24]. Исследование СДГ проводили при митохондриальной миопатии [25]. G. Kollberg и соавт. исследовали активность СДГ при рабдомиолизе [26].

В связи с появлением энерготропных препаратов — аналогов природных веществ, участвующих в метаболизме митохондрий, актуальным является поиск и применение методик для оценки функции митохондрий, определения показаний к применению этих препаратов.

Для коррекции функции дыхательной цепи митохондрий в настоящее время существуют препараты янтарной кислоты (II комплекс), коэнзима  $Q_{10}$  (III комплекс), цитохром С (IV комплекс). Во II комплексе дыхательной цепи участвует фермент СДГ, определение активности которого позволяет принять решение о необходимости назначения препаратов, которые компенсируют эти нарушения. К ним относятся препараты янтарной кислоты, которые не назначают на продолжительный срок. Поэтому для длительного применения используют препараты коэнзима  $Q_{10}$ , которые производят в форме для приема внутрь, что позволяет применять их самостоятельно в домашних условиях. Кудесан и кудевита представляют собой молекулу убихинона (коэнзима  $Q_{10}$ ), которая плохо проходит через гематоэнцефалический барьер. А идебенон (коэнзима  $Q_6$ ) — синтетический аналог убихинона. Он имеет меньшую боковую цепь, хорошо проникает через гематоэнцефалический барьер, и может быть назначен пациентам с нервно-мышечной патологией, обусловленной поражением передних рогов спинного мозга (спинальные мышечные атрофии). Для коррекции нарушений жирового обмена митохондрий имеются препараты карнитина, который участвует в жировом обмене митохондрий и осуществляет перенос жирных кислот внутрь органеллы. Для определения показаний к его назначению может быть использовано определение карнитина в крови методом tandemной масс-спектрометрии. Также о необходимости назначения препаратов карнитина можно косвенно судить по активности фермента  $\alpha$ -глицерофосфатдегидрогеназы ( $\alpha$ -ГФДГ) в лимфоцитах крови, играющего большую роль в биосинтезе липидов в митохондриях. Для этого используют метод цитохимического исследования активности митохондриальных ферментов в лимфоцитах периферической крови, предложенный A.G.E. Pearse в модификации Р.П. Нарциссова [22].

При нервно-мышечных болезнях возможно вторичное нарушение углеводного обмена (анаэробный гликолиз), которое, возможно, является следствием нарушения окислительного фосфорилирования (нарушение в цикле дыхательной цепи митохондрий). В этих условиях глюкоза превращается в молочную кислоту, которая накапливается в клетках крови. О наличии анаэробного гликолиза можно судить по увеличению уровня лактата в крови и активности фермента лактатдегидрогеназы (ЛДГ), которая катализирует превращение лактата в пируват. Для коррекции этих нарушений существуют препараты — димефосфон, дихлорацетат, карнозин. Для определения уровня лактата в крови используют калориметрический тест, жидкостную хроматографию, комплексометрическое титрование. Однако предпочтительными являются ферментативные методы, основанные на каталитическом действии ферментов лактатоксидазы и ЛДГ. Это простые способы, однако они обеспечивают самую

высокую специфичность и точность. Для исследования активности ЛДГ применяют оптический тест Варбурга, калориметрические методы (реакцию с 2,4-динитрофенилгидразином (метод Севела—Товарека), энзим-электрофорез. Для коррекции нарушений функции митохондрий применяют с успехом препараты, в состав которых входят вещества, участвующие в тканевом дыхании, в комплексах дыхательной цепи митохондрий [27–31]. Проанализирована эффективность идебенона при миопатии Дюшенна [32, 33].

Таким образом, выявление митохондриальных нарушений у больных, в том числе с нервно-мышечной патологией, актуально ввиду появления препаратов, улучшающих функцию митохондрий. Для определения показаний к их назначению важно использование методов оценки митохондриальных нарушений.

**Цель исследования** — определить изменение внутриклеточной активности митохондриальных ферментов (СДГ,  $\alpha$ -ГФДГ, ГДГ, ЛДГ) при нервно-мышечных заболеваниях.

#### Материалы и методы

Обследовали 74 больных с нервно-мышечными заболеваниями. Оценивали активность 4 ферментов митохондрий, участвующих в углеводном обмене (ЛДГ), обмене аминокислот (ГДГ), жирных кислот ( $\alpha$ -ГФДГ) и II комплексе дыхательной цепи митохондрий (СДГ).

Для цитохимического исследования активности митохондриальных ферментов в лимфоцитах периферической крови использовали метод, предложенный A.G.E. Pearse в модификации Р.П. Нарциссова [22].

Использовали химические реактивы: фиксаторы для мазков крови (ацето-трилон), цитохимические наборы для определения активности дегидрогеназ (ООО НПП «Поликом»), краситель для окрашивания ядер (метиленовый зеленый).

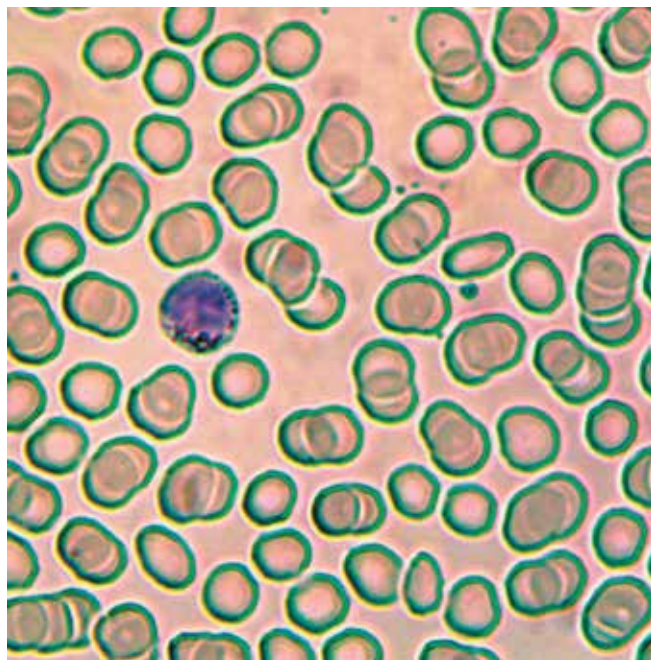
Оборудование: бинокулярный микроскоп (увеличение не менее  $\times 10^{40}$ ), оснащенный объективом с водной иммерсией, водяной термостат, обеспечивающий поддержание температуры с точностью до 0,1 °C, рН-метр.

#### Метод количественного цитохимического определения активности ферментов в клетках периферической крови (постановка реакций)

Реакции проводятся на мазках крови, приготовленных на обезжиренных предметных стеклах. Мазки высушивают на воздухе при комнатной температуре в течение 10–15 мин. Постановка реакции включает 3 этапа: фиксацию мазков, реакцию для выявления активности ферментов, докраску ядер.

Фиксация препаратов проводится в 60 % растворе ацетона, насыщенном трилоном Б при рН 5,2–5,4 при комнатной температуре в течение 30–40 с (для лимфоцитов). После фиксации препараты промывают дистиллированной водой и высушивают при комнатной





**Рис. 1.** Микроскопия мазка крови ( $\times 600$ ): выявление активности  $\alpha$ -глицерофосфатдегидрогеназы в лимфоцитах количественным цитохимическим методом; темные гранулы по периферии клетки — продукт реакции

Fig. 1. Blood smear microscopy ( $\times 600$ ): detection of the activity of  $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase in lymphocytes by a quantitative cytochemical method; dark granules around the periphery of the cell — a reaction product

температуре на воздухе. Состав инкубационной среды: на 40 мл фосфатного буфера 13 мг п-нитротетразолия фиолетового, 13 мг трилона Б, специфический субстрат для определенного фермента. Реакция проводится при pH 7,3 и температуре 37 °C в течение 60 мин в водном термостате. После инкубации мазки промывают водой и погружают в насыщенный раствор метилового зеленого (ядерного красителя) на 15–20 с, после чего мазки вновь промывают и высушивают при комнатной температуре на воздухе.

Готовые мазки микроскопируются под водной иммерсией на микроскопе Микмед-6. Об активности фермента в клетке судят по количеству темно-фиолетовых гранул формазана, образовавшихся в процессе восстановления п-нитротетразолия фиолетового. Для определения активности фермента в популяции лимфоцитов вручную подсчитывают количество гранул в 30–100 клетках (рис. 1). Ферментативная активность при использовании этого метода выражали в гранулах/лимфоцитах (количество гранул на лимфоцит), что соответствует среднему числу гранул продукта цитохимической реакции — формазана.

**Статистический анализ.** Определяли среднюю арифметическую величину, стандартную ошибку, медиану и доверительный интервал медианы. Для определения достоверности отличий показателей у больных с контрольной группой использовали t-критерий Стьюдента. При малых выборках применяли непараметрический

критерий Вилкоксона—Манна—Уитни. Статистически значимым считалось отличие при  $p < 0,05$ .

## Результаты

### Митохондриальные нарушения при нервно-мышечной патологии

#### Наследственная моторно-сенсорная невропатия.

Обследовано 12 больных с I типом и 15 — со II типом заболевания. Диагноз основывался на данных клинического, электронейромиографического, генеалогического исследований. Из них у 2 обследованных с НМСН I типа определена дупликация экзонов 2–5 генов *PMP* в гетерозиготном состоянии на хромосоме 17p11.2-p12 (локус ШМТ IA). У 1 больного в гене Шарко—Мари—Тута *IX GJB1* выявлен патогенный вариант C.295C>T (р. GLN99\*) в гетерозиготном состоянии. В остальных случаях мутации не идентифицированы. У больных с НМСН II типа мутации в генах НМСН не выявлены.

У больных с НМСН I типа выявлено снижение среднего показателя активности СДГ ( $p < 0,05$ ) (см. рис. 1). В этой группе больных показатель варьировал от 14,8 гр/лимфоцит (снижение активности фермента), до 21,7 гр/лимфоцит (компенсаторное повышение активности фермента II комплекса дыхательной цепи митохондрий). Средний показатель активности фермента  $\alpha$ -ГФДГ был снижен, но статистически незначимо. Он варьировал от 5,3 до 8,8 гр/лимфоцит. Средний показатель активности ГДГ был снижен по сравнению с контрольными данными ( $p < 0,05$ ). В этой группе больных он варьировал от 5,3 до 10,4 гр/лимфоцит. Средний показатель активности ЛДГ не отличался от контрольных данных и варьировал от 10,7 до 22,3 гр/лимфоцит.

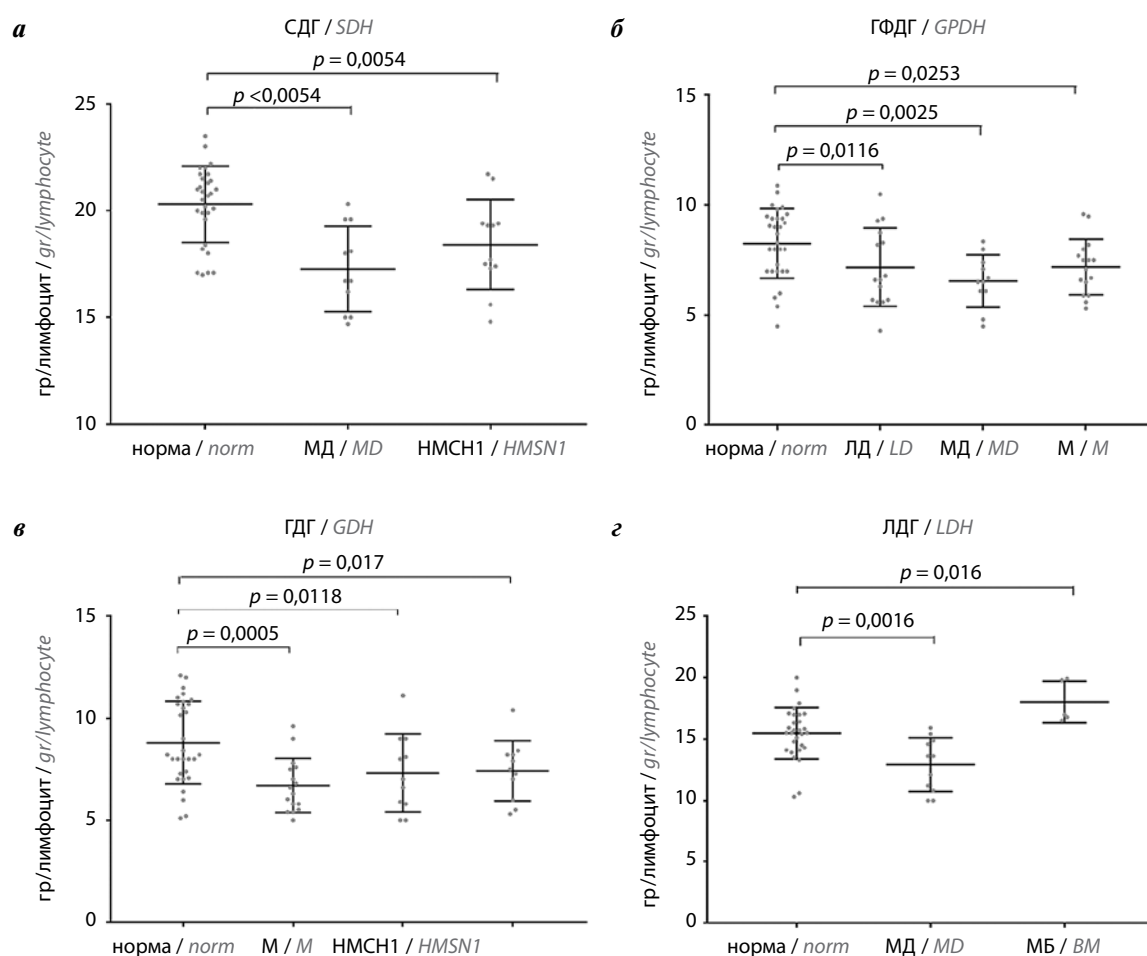
Результаты активности ферментов у 15 больных с НМСН II типа были статистически недостоверны: средний показатель активности СДГ был несколько ниже контрольных данных ( $p > 0,05$ ). Показатель варьировал от 16,7 (снижение активности фермента) до 23,2 гр/лимфоцит (компенсаторное повышение активности фермента). Среднее значение активности  $\alpha$ -ГФДГ в группе больных было снижено ( $p > 0,05$ ). Показатель у больных варьировал от 3,5 (значительное снижение) до 11,1 гр/лимфоцит (компенсаторное повышение). Среднее значение показателя ГДГ было несколько снижено по сравнению с контрольными данными ( $p > 0,05$ ). Показатель варьировал от 10,9 (снижение) до 21,4 гр/лимфоцит (повышение).

При сравнении групп больных с НМСН I и II типов можно отметить более выраженные изменения показателей у больных с НМСН I типа.

**Лице-лопаточно-плечевая мышечная дистрофия (ЛЛПМД, миопатия Ландузи—Дежерины).** Заболевание наследуется по аутосомно-доминантному типу. Описано 2 типа болезни, оба имеют одинаковые симптомы заболевания и различаются по генетической причине.

ЛЛПМД обусловлена изменением в области конца длинного плеча хромосомы 4 (регион D4Z4). Этот регион состоит в норме из 11–100 повторяющихся сегментов. Вся область D4Z4 обычно гиперметилирована. Добавление метильных групп отключает («заставляет замолчать») гены, поэтому в гиперметилированных участках ДНК меньше включенных (активных) генов. При заболевании область D4Z4 гипометилирована. При ЛЛПМД I типа гипометилирование возникает из-за укорочения области D4Z4, которая содержит от 1 до 10 повторов вместо обычных 11–100 повторов. При ЛЛПМД II типа гипометилирование чаще всего возникает из-за мутаций в гене *SMCHD1*, который

отвечает за предоставление инструкции для получения белка, который обычно гиперметилирует область D4Z4. Но примерно 20 % людей с ЛЛПМД II типа не имеют мутации в гене *SMCHD1*, и причина гипометилирования неясна. Обследовано 15 больных. Диагноз был установлен на основании клинических генеалогических, электромиографических данных, повышения уровня креатинфосфокиназы в крови. Молекулярно-генетических нарушений выявлено не было в связи со сложностями проведения исследования. Средние значения активности митохондриальных ферментов СДГ,  $\alpha$ -ГФДГ и ГДГ были снижены (рис. 2). При этом активность  $\alpha$ -ГФДГ была снижена у больных



**Рис. 2.** Цитохимическая активность митохондриальных ферментов лимфоцитов периферической крови: а – сукцинатдегидрогеназа (СДГ); б –  $\alpha$ -глицерофосфатдегидрогеназа (ГФДГ); в – глутаматдегидрогеназа (ГДГ); г – лактатдегидрогеназа (ЛДГ). Ось ординат – цитохимическая активность лимфоцитов периферической крови (количество гранул/лимфоцит). Ось абсцисс – обследуемые группы: норма ( $n = 30$ ), МД – миотоническая дистрофия ( $n = 11$ ), HMSN I – наследственная моторно-сенсорная невропатия I типа ( $n = 12$ ), МБ – миопатия Беккера ( $n = 5$ ), ЛД – лице-лопаточно-плечевая мышечная дистрофия (миопатия Ландузи-Дежерина) ( $n = 15$ ), М – миастения ( $n = 16$ ); точки – пациенты и обследуемые в контрольной группе здоровых лиц; вертикальная черта – шкала, на которой горизонтальными чертами отмечены медиана (посередине) и ее доверительный интервал;  $p$  – показатель достоверности различий медиан

**Fig. 2.** Cytochemical activity of mitochondrial enzymes of peripheral blood lymphocytes: а – succinate dehydrogenase (SDH); б –  $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase ( $\alpha$ -GPDH); в – glutamate dehydrogenase (GDH); г – lactate dehydrogenase (LDH). The ordinate axis – the cytochemical activity of peripheral blood lymphocytes (number of granules/lymphocyte); the abscissa axis – the examined groups: norm ( $n = 30$ ), MD – myotonic dystrophy ( $n = 11$ ), HMSN I – hereditary motor-sensory neuropathy type I ( $n = 12$ ), BM – Becker myopathy ( $n = 5$ ), LD – facial-scapular-brachial muscular dystrophy (Landusi–Dejerine myopathy) ( $n = 15$ ), M – myasthenia gravis ( $n = 16$ ); points – patients and subjects in the control group of healthy individuals; vertical line – a scale on which horizontal lines mark the median (in the middle) and its confidence interval;  $p$  – indicator of the significance of differences in medians

( $7,18 \pm 0,46$  гр/лимфоцит) и в контрольной группе ( $8,25 \pm 0,288$  гр/лимфоцит) ( $p < 0,05$ ). Изменение активности митохондриальных ферментов отмечалось не у всех больных. У 2 больных активность СДГ и ГДГ не была изменена. У 3 активность  $\alpha$ -ГФДГ была в пределах нормальных значений. Среднее значение показателя активности ЛДГ было повышено ( $p > 0,05$ ).

**Миотоническая дистрофия.** Обследовано 11 больных миотонической дистрофией I типа, обусловленной мутацией в гене *DPMK*. Средние значения показателей активности митохондриальных ферментов СДГ,  $\alpha$ -ГФДГ, ГДГ и ЛДГ были снижены ( $p < 0,05$ ) (см. рис. 2). Также было снижение показателей активности митохондриальных ферментов СДГ и  $\alpha$ -ГФДГ у всех обследованных больных. Активность этих ферментов была в пределах нормальных значений у 1 больного, а ЛДГ — у 7.

**Миопатия Беккера.** Ген *DMD* расположен в локусе Хр21.2. Тип наследования Х-сцепленный, рецессивный. Обследовано 5 больных. Диагноз был подтвержден молекулярно-генетическим методом. Средние значения медианы активности митохондриальных ферментов СДГ,  $\alpha$ -ГФДГ, ГДГ ( $p > 0,05$ ). Средний показатель медианы активности ЛДГ повышен ( $17,0$  гр/лимфоцит) у больных и ( $15,5$  гр/лимфоцит) в контрольной группе ( $p < 0,05$ ). У всех больных показатели активности СДГ были изменены (в 2 случаях активность снижена и в 3 — компенсаторно повышена). Активность  $\alpha$ -ГФДГ была снижена у 3 больных и у 2 — в пределах нормальных значений. Уровень лактата в крови исследовали у 4 больных: в 3 случаях он был повышен от 3 до 4,6 ммоль/л, а в 1 — в пределах нормальных значений. При максимальном повышении уровня лактата в крови отмечалось самое выраженное снижение показателя СДГ (на 15 %). Также в этом случае был снижен показатель  $\alpha$ -ГФДГ (на 44 %) и ГДГ (на 21 %). Уровень внутриклеточной активности ЛДГ у него был в пределах нормы. У остальных 2 больных с повышением уровня лактата в крови наблюдалось компенсаторное повышение активности СДГ (на 12,1 % при уровне лактата в крови 3,8 ммоль/л; на 3,8 % при уровне лактата — 3,0 ммоль/л). У 1 из этих больных активность  $\alpha$ -ГФДГ была снижена на 26,7 %, а у другого — в пределах нормы. Активность ГДГ у одного из этих больных была снижена на 33,3 %, у другого — в пределах нормы. Внутриклеточная активность ЛДГ в одном случае была в пределах нормальных значений, в другом — повышена на 16,5 %. После нагрузки углеводами показатель снижался у всех обследованных больных, но не достигал нормальных значений.

**Миастения.** Заболевание обусловлено образованием аутоантител к рецепторам ацетилхолина и нарушением нервно-мышечной проводимости, приводящей к слабости и патологической утомляемости. Обследовано 16 взрослых больных миастенией. Средний показатель активности СДГ у больных был ниже, чем в контрольной группе ( $p > 0,05$ ). У части больных отмечалось снижение активности фермента, у других — компен-

саторное повышение. Средний показатель активности  $\alpha$ -ГФДГ был достоверно у больных миастенией (см. рис. 2б). Он варьировал от 5,6 (снижение) до 9,6 гр/лимфоцит (компенсаторное повышение). Средний показатель активности ГДГ был ниже в группе больных миастенией по сравнению с группой здоровых лиц ( $p < 0,05$ ). У больных он варьировал от 5,0 (снижение активности) до 9,6 гр/лимфоцит (компенсаторное повышение). Среднее значение показателя активности ЛДГ были несколько ниже по сравнению с контрольной группой ( $p > 0,05$ ). Показатель варьировал от 8,0 (снижение активности фермента) до 23,6 гр/лимфоцит (компенсаторное повышение). Таким образом, при миастении выявлены нарушения метаболизма в митохондриях. Отмечено как компенсаторное повышение активности ферментов, так и снижение их активности, свидетельствующее о декомпенсации сохранения нормального метаболизма. Определение активности ферментов митохондриального обмена может быть использовано при назначении энерготропных препаратов с различной точкой их приложения, а также для контроля и коррекции дозы препарата.

### Обсуждение

Таким образом, было проведено цитохимическое исследование активности митохондриальных ферментов лимфоцитов периферической крови при различных формах нервно-мышечной патологии. Наибольшие изменения выявлены при миотонической дистрофии. Отмечено статистически достоверное снижение среднего значения активности всех исследуемых ферментов — СДГ,  $\alpha$ -ГФДГ, ГДГ, ЛДГ ( $p < 0,05$ ). При НМСН I типа статистически значимо снижена активность СДГ и ГДГ. При НМСН I типа отклонения активности митохондриальных ферментов более выраженные по сравнению с НМСН II типа. У больных миастенией было отмечено статистически достоверное снижение активности  $\alpha$ -ГФДГ и ГДГ. При миопатии Ландузи—Дежерина показатели активности СДГ,  $\alpha$ -ГФДГ и ГДГ были снижены, из них для  $\alpha$ -ГФДГ статистически значимо.

При анализе каждого случая в группах больных с исследуемой патологией было показано, что, кроме пациентов с миотонической дистрофией, при которой у всех больных снижалась активность СДГ,  $\alpha$ -ГФДГ и ГДГ, в остальных случаях у части больных исследуемая активность ферментов не была изменена.

Изменение активности СДГ свидетельствует о нарушении в дыхательной цепи митохондрий [34–36]. Отмечается как компенсаторное повышение активности фермента, так и снижение его активности. При миастении изменение активности СДГ обусловлено, вероятно, гипоксией у больных из-за слабости дыхательной мускулатуры. При наследственных нервно-мышечных заболеваниях, не являющихся первично-митохондриальными заболеваниями, изменение активности СДГ,



вероятно, связано со вторичным нарушением функции митохондрий. У всех обследуемых больных с миотонической дистрофией выявлено изменение активности СДГ. При остальных формах нервно-мышечной патологии изменение активности СДГ было выявлено не у всех больных. Поэтому возможно использование цитохимического метода для оценки активности СДГ при назначении энерготропных препаратов, влияющих на дыхательную цепь митохондрий.

При снижении показателя СДГ необходимо назначать для длительного лечения препараты коэнзима  $Q_{10}$  в дозе не менее 90 мг/сут при суточной потребности 500 мг. При отсутствии нормализации показателя активности СДГ доза препарата может быть повышена. При компенсаторном повышении активности фермента СДГ также желательно назначать препарат коэнзима  $Q_{10}$ , чтобы не было истощения функции II комплекса дыхательной цепи митохондрий, но, возможно, в меньшей дозировке.

В исследовании были выявлены нарушения в жировом обмене митохондрий при нервно-мышечной патологии, о чем свидетельствовало изменение активности  $\alpha$ -ГФДГ, которая участвует в различных видах обмена в митохондриях и в жировом в том числе. В жировом обмене митохондрий принимает участие карнитин. Он осуществляет перенос жирных кислот через мембрану митохондрий. Поэтому препараты карнитина могут быть использованы для коррекции нарушения жирового обмена митохондрий. Наиболее выраженное снижение активности  $\alpha$ -ГФДГ выявлено при миотонической дистрофии. Также изменение активности  $\alpha$ -ГФДГ выявляется при других формах нервно-мышечной патологии. Эти изменения определялись не у каждого больного. Используемый цитохимический метод позволяет выявлять нарушения в жировом обмене митохондрий и учитывать эти данные при назначении препарата карнитина. Снижение активности фермента свидетельствует о декомпенсации его работы, снижении метаболизма. Назначение карнитина будет способствовать поступлению жирных кислот в клетку и активации метаболизма жирных кислот.

Нарушение аминокислотного обмена оценивали по определению активности ГДГ. Наибольшие изменения были выявлены при поясно-конечностной миопатии, миастении, миотонической дистрофии.

При исследовании активности ЛДГ выявлено статистически значимое повышение ее активности при наследственной моторно-сенсорной невропатии.

Полученные данные свидетельствуют о наличии митохондриальных нарушений при исследуемых нервно-мышечных заболеваниях и обоснованности назначения энерготропной терапии. Д.В. Влодавец и соавт. [37] сообщили о клиническом улучшении и об увеличении активности митохондриальных ферментов лимфоцитов периферической крови при миопатиях при назначении препаратов коэнзима  $Q_{10}$  и карнитина, янтарной кислоты.

В дыхательной цепи митохондрий осуществляется передача электронов от НАДФ к коэнзиму  $Q_{10}$  (I комплекс), от янтарной кислоты к коэнзиму  $Q_{10}$  (II комплекс), от коэнзима  $Q_{10}$  к цитохрому C (III комплекс) и от цитохрома C к молекуле кислорода (IV комплекс). От всех комплексов дыхательной цепи электроны передаются для образования молекулы аденозинтрифосфата (V комплекс). Исследование активности СДГ (II комплекс дыхательной цепи) позволяет косвенно оценить уровень экспрессии генов биогенеза мтДНК и митохондриальной массы, определить показания к назначению препаратов коэнзима  $Q_{10}$ . При нарушении функции II комплекса дыхательной цепи митохондрий назначают препараты янтарной кислоты. Но они используются для коротких курсов лечения. Для длительного применения используют препараты коэнзима  $Q_{10}$ . А также идебенон, который имеет короткую боковую цепь и проникает через гематоэнцефалический барьер, что важно учитывать у больных со спинальной амиотрофией.

При изменении показателя активности  $\alpha$ -ГФДГ возможно назначение препаратов карнитина. Однако следует учитывать, что при сниженном уровне бета-окисления в митохондриях, дополнительная доставка жирных кислот (что делает карнитин) только усугубит митохондриальные нарушения в цикле бета-окисления. Карнитин улучшает доставку жирных кислот через митохондриальную мембрану. Но следует учитывать, что она не всегда может быть нарушена. Возможно, целесообразно применение милдроната, который тормозит перенос жирных кислот и позволяет облегчить нагрузку на данный метаболический путь в митохондриях.

Изменение уровня ЛДГ может быть показанием для назначения карнозина, который повышает работоспособность мышцы из-за нормализации pH крови при нарушении метаболизма лактата. Карнозин оказывает благоприятное воздействие на гликолиз, окислительное фосфорилирование, увеличивает образование аденозинтрифосфата [38–40]. Карнозин оказывает положительное воздействие при экспериментальном инсульте у крыс, уменьшая зону ишемической полутени. Таким образом, учитывая, что инсульт — это острая ишемия, при котором блокируется I комплекс дыхательной цепи и начинает активно компенсаторно работать II комплекс, что приводит к дальнейшему его истощению, и то, что карнозин оказывает положительное действие при этом, по-видимому, изменение активности СДГ тоже является показанием к назначению карнозина. Учитывая то, что  $\alpha$ -ГФДГ участвует в различных видах обмена митохондрий (жирового и др.), изменение ее активности тоже может служить показанием к назначению карнозина. Л.П. Гринию сообщила о положительном эффекте карнозина при наследственной нервно-мышечной патологии [41].

В связи с появлением новых препаратов, аналогов метаболитов митохондрий, актуальным становится применение методов исследования для оценки функции митохондрий у больных с неврологической патологией и другими заболеваниями.

Существуют методы исследования этих метаболитов в плазме крови. Также исследуют активность митохондриальных ферментов. Вероятно, комплексное применение этих методов является наиболее успешным в выборе

энерготропных препаратов у больных и контроле лечения больных наряду с оценкой клинического состояния.

### Заключение

При нервно-мышечных заболеваниях имеются нарушения работы митохондрий. Следовательно, надо рассматривать таких пациентов и как метаболических больных и назначать метаболическую, антиоксидантную терапию.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Afshin-Majd S., Bashiri K., Kiasalari Z. et al. Acetyl-L-carnitine protects dopaminergic nigrostriatal pathway in 6-hydroxydopamine-induced model of Parkinson's disease in the rat. *Biomed Pharmacother* 2017;89:1–9. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.02.007. PMID: 28199883.
2. Yoritaka A., Kawajiri S., Yamamoto Y. et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled pilot trial of reduced coenzyme Q10 for Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2015;21(8):911–6. DOI: 10.1016/j.parkreldis.2015.05.022. PMID: 26054881.
3. Li Z., Wang P., Yu Z. et al. The effect of creatine and coenzyme q10 combination therapy on mild cognitive impairment in Parkinson's disease. *Eur Neurol* 2015;73(3–4):205–11. DOI: 10.1159/000377676. PMID: 25792086.
4. Joshi A.U., Ebert A.E., Haileselassie B., Mochly-Rosen D. Drp1/Fis1-mediated mitochondrial fragmentation leads to lysosomal dysfunction in cardiac models of Huntington's disease. *J Mol Cell Cardiol* 2019;127:125–33. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2018.12.004.
5. Zhou Z., Austin G.L., Young L.E.A. et al. Mitochondrial metabolism in major neurological diseases. *Cells* 2018;23(12):pii: E229. DOI: 10.3390/cells7120229. Review. PMID: 30477120.
6. Gautam M., Jara J.H., Kocak N. et al. Mitochondria, ER, and nuclear membrane defects reveal early mechanisms for upper motor neuron vulnerability with respect to TDP-43 pathology. *Acta Neuropathol* 2019;137(1):47–69. DOI: 10.1007/s00401-018-1934-8. PMID: 30450515.
7. Lu M.H., Zhao X.Y., Yao P.P., Xu D.E., Ma Q.H. The Mitochondrion: A Potential Therapeutic Target for Alzheimer's Disease. *Neurosci Bull* 2018;34(6):1127–30. DOI: 10.1007/s12264-018-0310-y.
8. Civate G., Dogan S.A., Cerutti R. et al. Rapamycin rescues mitochondrial myopathy via coordinated activation of autophagy and lysosomal biogenesis. *EMBO Mol Med* 2018;10(11):pii:e8799. DOI: 10.15252/emmm.201708799. PMID: 30309855.
9. Van Giau V., An S.S.A., Hulme J.P. Mitochondrial therapeutic interventions in Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 2018;395:62–70. DOI: 10.1016/j.jns.2018.09.033. PMID: 30292965.
10. Ranganathan S., Harmison G.G., Meyertholen K. et al. Mitochondrial abnormalities in spinal and bulbar muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 2009;18(1):27–42. DOI: 10.1093/hmg/ddv561. PMID: 29931346.
11. McClelland C., Manousakis G., Lee M.S. Progressive External Ophthalmoplegia. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2016;16(6):53. DOI: 10.1007/s11910-016-0652-7. PMID: 29938308.
12. Santacatterina F., Chamorro M., de Arenas C.N. et al. Quantitative analysis of proteins of metabolism by reverse phase protein microarrays identifies potential biomarkers of rare neuromuscular diseases. *J Transl Med* 2015;13:65. DOI: 10.1186/s12967-016-0904-y. PMID: 29929550.
13. Singh I., Faruq M., Padma M.V. et al. Investigation of mitochondrial DNA variations among Indian Friedreich's ataxia (FRDA) patients. *Mitochondrion* 2015;25:1–5. DOI: 10.1016/j.mito.2015.06.004. PMID: 26321457.
14. Clarke J.T. A clinical guide to inherited metabolic disease. Cambridge: University press, 2010. P. 338. DOI: 10.1017/CBO9780511544682.
15. Sure V.N., Sakamuri S.S.V.P., Sperling J.A. et al. A novel high-throughput assay for respiration in isolated brain microvessels reveals impaired mitochondrial function in the aged mice. *Geroscience* 2018;40(4):365–75. DOI: 10.1007/s11357-018-0037-8. PMID: 30074132.
16. Donnino M.W., Liu X., Andersen L. et al. Characterization of mitochondrial injury after cardiac arrest (COMICA). *Resuscitation* 2017;113:56–62. DOI: 10.1016/j.resuscitation.2016.12.029. PMID: 28126408.
17. Kim A.Y., Jeong K.H., Lee J.H. et al. Glutamate dehydrogenase as a neuro-protective target against brain ischemia and reperfusion. *Neuroscience* 2017;340:487–500. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2016.11.007. PMID: 27845178.
18. Orozco-Ibarra M., García-Morales J., Calvo-Silva F.J. et al. Striatal mitochondria response to 3-nitropropionic acid and fish oil treatment. *Nutr Neurosci* 2018;21(2):132–42. DOI: 10.1080/1028415X.2016.1237074. PMID: 27682807.
19. Ahmed Alamoudi W., Ahmad F., Acharya S. et al. A simplified colorimetric method for rapid detection of cell viability and toxicity in adherent cell culture systems. *J BUON* 2018;23(5):1505–13. PMID: 30570879.
20. Qadri R., Namdeo M., Behari M. et al. Alterations in mitochondrial membrane potential in peripheral blood mononuclear cells in Parkinson's disease: potential for a novel biomarker. *Restor Neurol Neurosci* 2018;36(6):719–27. DOI: 10.3233/RNN-180852. PMID: 30282380.
21. Monzio C.G., Kleiner G., Bordon A. et al. Mitochondrial dysfunction in fibroblasts of multiple system atrophy. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2018;1864(12):3588–97. DOI: 10.1016/j.bbadis.2018.09.018. PMID: 30254015.
22. Курбатова О.В., Сурков А.Н., Намазова-Баранова Л.С. и др. Митохондриальная дисфункция у детей с печеночными формами гликогеновой болезни. *Вестник Российской академии медицинских наук* 2014;69(7–8):78–84. DOI: 10.15690/vramn.v72i3. [Kurbatova O.V., Surkov A.N., Namazova-Baranova L.S. et al. Mitochondrial dysfunction in children with hepatic forms of glycogen disease. *Vestnik rossyskoy akademii edicinskikh nauk = Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences* 2014;69(7–8):78–84. (In Russ.).]
23. Jones A.J., Hirst J. A spectrophotometric coupled enzyme assay to measure the activity of succinate dehydrogenase.



- Anal Biochem 2013;442(1):19–23. DOI: 10.1016/j.ab.2013.07.018. PMID:23886887.
24. Botman D., Tigchelaar W., Van Noorden C.J. Determination of glutamate dehydrogenase activity and its kinetics in mouse tissues using metabolic mapping (quantitative enzyme histochemistry). *J Histochem Cytochem* 2014;62(11): 802–12. DOI: 10.1369/0022155414549071. PMID: 25124006.
  25. Gao M., Liu W., Chen Y., Zhang W. Cytochrome oxidase and succinate dehydrogenase double staining method in mitochondrial myopathy. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 2015;44(3):208–9. PMID: 2626876.
  26. Kollberg G., Melberg A., Holme E., Oldfors A. Transient restoration of succinate dehydrogenase activity after rhabdomyolysis in iron-sulphur cluster deficiency myopathy. *Neuromuscul Disord* 2011;21(2):115–20. DOI: 10.1016/j.nmd.2010.11.010. PMID: 21196119.
  27. Gimenes A.C., Bravo D.M., Nápolis L.M. et al. Effect of L-carnitine on exercise performance in patients with mitochondrial myopathy. *Braz J Med Biol Res* 2015;48(4):354–62. DOI: 10.1590/1414-431X20165247. PMID: 9924138.
  28. Nicolson G.L. Mitochondrial dysfunction and chronic disease: treatment with natural supplements. *Altern Ther Health Med* 2014;20(1):18–25. DOI: 10.2307/2700127. PMID: 29859509.
  29. Kato K., Mizota T., Hirota K., Fukuda K. Successful perioperative management of a patient with primary systemic carnitine deficiency: a case report. *J Anesth* 2013;27(1):141–2. DOI:10.1093/bja/ael103. PMID: 29938387.
  30. Han L.S., Ye J., Qiu W.J. et al. Primary carnitine deficiency in 17 patients: diagnosis, treatment and follow up. *Zhonghua Er Ke Za Zhi* 2012;50(6):405–9. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0578-1310. PMID: 29902860.
  31. LoMauro A., D'Angelo M.G., Aliverti A. Assessment and management of respiratory function in patients with Duchenne muscular dystrophy: current and emerging options. *Ther Clin Risk Manag* 2015;11:1475–88. DOI: 10.2147/TCRM.S87876. PMID: 29928125.
  32. Mercuri E., Muntoni F. Efficacy of idebenone in Duchenne muscular dystrophy. *Lancet* 2015;385(9979):1704–6. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)00562-6. PMID: 29937195.
  33. Buyse G.M., Voit T., Schara U. et al. DELOS Study Group. Efficacy of idebenone on respiratory function in patients with Duchenne muscular dystrophy not using glucocorticoids (DELOS): a double-blind randomised placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet* 2015;385(9979):1748–57. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)00562-6. PMID: 29937195.
  34. Лукьянова Л.Д., Кирова Ю.И., Германова Э.Л. Роль сукцината в регуляции срочной экспрессии HIF-1A при гипоксии. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 2017;164(9):273–9. [Luk'yanova L.D., Kirova Yu.I., Germanova E.L. The role of succinate in the regulation of urgent expression of HIF-1A in hypoxia. *B'yulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny* = *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2017;164(9):273–9. (In Russ.)].
  35. Lukyanova L.D., Kirova Y.I. Mitochondria-cjntrolled signaling mechanisms of brain protection in hypoxia. *Frontiers in Neuroscience* 2015;9(ОСТ):320. DOI: 10.3389/fnins.2015.00320. PMID: 26483619.
  36. Lukyanova L.D., Kirova Y.I., Germanova E.L. Energotropic effect of intermittent hypoxia: role of succindt-depend signaling. *Intermittent Hypoxia and Human Diseases* London, 2012. P. 239–252.
  37. Влодавец Д.В., Белоусова Е.Д., Сухоруков В.С., Харламов Д.А. Способ лечения врожденных структурных миопатий и врожденных мышечных дистрофий путем коррекции вторичных митохондриальных изменений. *Автореф. дис. ... канд. мед. наук*. Москва, 2009. 28 с. [Vlodavets D.V., Belousova E.D., Sukhorukov V.S., Kharlamov D.A. A method for the treatment of congenital structural myopathies and congenital muscular dystrophies by correcting secondary mitochondrial changes. *Abstr. diss. ... cand. med. sciences*. Moscow, 2009. 28 p. (In Russ.)].
  38. Stvolinsky S., Boldyrev A., Toropova K. et al. Carnosine and its(S)-Trolox™ derivative protect animals against oxidative stress. *Amino Acids* 2012;43:165–70. DOI: 10.1007/s00726-012-1256-4. PMID: 22389054.
  39. Stvolinsky S.L., Bulygina E.R., Fedorova T.N. et al. Biological activity of novel synthetic derivatives of carnosine. *Cellular and Molecular Neurobiology* 2010;30(3):395–404. DOI: 10.1007/s10571-009-9462-7. PMID: 19798566.
  40. Федорова Т.Н., Стволинский С.Л., Куликова О.И. и др. Эффективность нейтропротекторного действия карнозина в составе нанолипосом и S-тролокс-карнозина в условиях окислительного стресса *in vitro* и *in vivo*. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии* 2016;10(1):47–52. [Fedorova T.N., Stvolinskiy S.L., Kulikova O.I. et al. The effectiveness of the neuroprotective effect of carnosine in the composition of nanoliposomes and S-trolox-carnosine under conditions of oxidative stress *in vitro* and *in vivo*. *Annaly klinicheskoy i eksperimentalnoy neurologii* = *Annals of Clinical and Experimental Neurology* 2016;10(1):47–52. (In Russ.)].
  41. Гринио Л.П. Роль карнозина при патологии мышц. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии* 2011;10:62–7. [Grinio L.P. The role of carnosine in muscle pathology. *Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy i farmactevticheskoy khimii* = *Questions of biological, medical and pharmaceutical chemistry* 2011;10:62–7. (In Russ.)].

# Вклад авторов

С.В. Котов: разработка идеи исследования, отбор пациентов для исследования, анализ полученных материалов, обобщение, написание и редактирование текста рукописи;

О.П. Сидорова: составление плана исследования, отбор пациентов для исследования, сбор и анализ литературы, статистический анализ полученных данных, обобщение, написание и редактирование текста рукописи;

Е.В. Бородатая: получение данных для анализа, обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных, написание текста рукописи.

# Authors' contributions

S.V. Kotov: development of research ideas, selection of patients for research, analysis of the materials obtained, generalization, writing and editing of the text of the manuscript;

O.P. Sidorova: drawing up a research plan, selecting patients for research, collecting and analyzing literature, statistical analysis of the data obtained, generalizing, writing and editing the text of the manuscript;

E.V. Borodataya: obtaining data for analysis, review of publications on the topic of the article, analysis of the data obtained, writing the text of the manuscript.

**ORCID авторов/ORCID of authors**

С.В. Котов/S.V. Kotov: <http://0000-0002-8706-7317>

О.П. Сидорова/O.P. Sidorova: <http://0000-0002-0096-9140>

Е.В. Бородатая/E.V. Borodataya: <http://0000-0003-4113-5700>

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

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

**Финансирование.** Исследование проводилось без спонсорской поддержки.

**Financing.** The study was performed without external funding.