

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

ISSN 2713-0428 (online)

БИОМЕДИЦИНА

SCIENTIFIC JOURNAL

JOURNAL BIOMED

Том (Vol. 17

2021

3E



ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий
ФМБА России»

БИОМЕДИЦИНА

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Издается с 2005 г.
4 выпуска в год

2021, Том 17, №3Е

Scientific Center of Biomedical Technologies
of the Federal Medical and Biological Agency of Russia

JOURNAL BIOMED

SCIENTIFIC JOURNAL

Published since 2005.
Quarterly.

2021, Vol. 17, No.3E

БИОМЕДИЦИНА

Biomeditsina

Научный журнал «Биомедицина» основан в 2005 году Научным центром биомедицинских технологий. Журнал издаётся на русском и английском языках. В журнале публикуются исследования по новым биомедицинским технологиям, моделям и методам исследований, конструированию новых линий животных-моделей (в том числе трансгенных, нокаутных, эпигеномных), эпигенетическим аспектам в биомедицине, экспериментальной и спортивной фармакологии, фармнутриентам, восстановительной медицине, биомедицинским аспектам клинической фармакологии. Журнал ориентирован на специалистов в области биологии, медицины, биомедицины и ветеринарии. В журнале опубликованы статьи авторов более чем из 200 различных организаций, география которых включает в себя практически всю Россию, а также Беларусь, Казахстан, Грузию, Украину, Нидерланды, Болгарию.

■ Главный редактор

Каркищенко Николай Николаевич, д.м.н., проф., чл.-корр. РАН, акад. РАРАН и Международной академии астронавтики (Париж)

■ Заместители главного редактора

Каркищенко Владислав Николаевич, д.м.н., проф.

Помыткин Игорь Анатольевич, к.х.н.

■ Ответственный секретарь

Алимкина Оксана Владимировна

■ Члены редакционного совета

Анохин Константин Владимирович, д.м.н., проф., акад. РАН (Москва, Россия)

Ачкасов Евгений Евгеньевич, д.м.н., проф. (Москва, Россия)

Баранов Виктор Михайлович, д.м.н., проф., акад. РАН (Москва, Россия)

Быков Анатолий Тимофеевич, д.м.н., проф., чл.-корр. РАН (Сочи, Россия)

Влахос Витан, д.м.н., проф., акад. Болгарской академии наук и искусств (София, Болгария)

Воевода Михаил Иванович, д.м.н., проф., акад. РАН (Новосибирск, Россия)

Галенко-Ярошевский Павел Александрович, д.м.н., проф., чл.-корр. РАН (Краснодар, Россия)

Дубина Михаил Владимирович, д.м.н., акад. РАН (Санкт-Петербург, Россия)

Дыгай Александр Михайлович, д.м.н., проф., акад. РАН (Томск, Россия)

Зефиоров Андрей Львович, д.м.н., проф., акад. РАН (Казань, Россия)

Кит Олег Иванович, д.м.н., проф., чл.-корр. РАН (Ростов-на-Дону, Россия)

Кузденбаева Раиса Салмаганбетовна, д.м.н., проф., акад. НАН Казахстана (Нур-Султан, Казахстан)

Кукес Владимир Григорьевич, д.м.н., проф., акад. РАН (Москва, Россия)

Макляков Юрий Степанович, д.м.н., проф. (Ростов-на-Дону, Россия)

Максимович Наталия Евгеньевна, д.м.н., проф. (Гродно, Республика Беларусь)

Матишов Геннадий Григорьевич, д.г.н., проф., акад. РАН (Ростов-на-Дону, Россия)

Мирошников Анатолий Иванович, д.х.н., акад. РАН (Москва, Россия)

Мурашёв Аркадий Николаевич, д.б.н., проф. (Пушино, Московская обл., Россия)

Оковитый Сергей Владимирович, д.м.н., проф. (Санкт-Петербург, Россия)

Пинелис Всеволод Григорьевич, д.м.н., проф. (Москва, Россия)

Пчелинцев Сергей Юрьевич, д.м.н., проф. (Любучаны, Московская обл., Россия)

Раменская Галина Владиславовна, д.фарм.н., проф. (Москва, Россия)

Рембовский Владимир Романович, д.м.н., проф. (Кузьмоловский, Ленинградская обл., Россия)

Решетов Игорь Владимирович, д.м.н., проф., акад. РАН (Москва, Россия)

Сычёв Дмитрий Алексеевич, д.м.н., проф., чл.-корр. РАН (Москва, Россия)

Хритинин Дмитрий Фёдорович, д.м.н., проф., чл.-корр. РАН (Москва, Россия)

Цыганков Борис Дмитриевич, д.м.н., проф., чл.-корр. РАН (Москва, Россия)

Цысь Валентина Ивановна, д.с.-х.н., проф., акад. РАЕН (Смоленск, Россия)

Ших Евгения Валерьевна, д.м.н., проф. (Москва, Россия)

Шустов Евгений Борисович, д.м.н., проф., акад. РАЕН (Санкт-Петербург, Россия)

БИОМЕДИЦИНА

Biomeditsina

История издания журнала:	Журнал издается с 2005 г.
Периодичность:	4 выпуска в год
Префикс DOI:	10.33647
ISSN	2074-5982 (Print) 2713-0428 (Online)
Свидетельство о регистрации СМИ:	Журнал зарегистрирован Комитетом РФ по печати. Свидетельство о регистрации: ПИ № ФС77-21324 от 09.06.2005
Индексация:	Журнал включен в Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук
Подписной индекс:	57995 в объединенном каталоге «Пресса России»
Стоимость одного выпуска:	400 руб.
Условия распространения материалов:	Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0 License
Учредитель:	ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России» 143442, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, влд. 1
Издатель:	ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России» 143442, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, влд. 1
Редакция:	143442, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, влд. 1 Тел.: +7 (495) 561-52-64 E-mail: info@scbmt.ru , scbmt@yandex.ru
Дата выхода в свет:	20.10.2021

JOURNAL BIOMED

The scientific journal “Journal Biomed” was founded in 2005 by the Scientific Center of Biomedical Technologies. The journal is published in Russian and English. The journal publishes research on new biomedical technologies, research models and methods, the construction of new lines of animal-models (including transgenic, knock-out, epigenomic), epigenetic aspects in biomedicine, experimental and sports pharmacology, pharmaceutical ingredients, rehabilitation medicine, biomedical aspects of clinical pharmacology. The journal is aimed at specialists in the field of biology, medicine, biomedicine and veterinary medicine. The journal published articles by authors from more than 200 different organizations, the geography of which includes almost all Russia, and Belarus, Kazakhstan, Georgia, Ukraine, Netherlands, Bulgaria.

■ Editor-in-Chief

Nikolay N. Karkischenko, Dr. Sci. (Med.), Prof., A.M. of the RAS, Acad. of the Russian Academy of Rocket and Artillery Sciences and International Academy of Astronautics (Paris)

■ Deputy Editors-in-Chief

Vladislav N. Karkischenko, Dr. Sci. (Med.), Prof.

Igor A. Pomytkin, Cand. Sci. (Chem.)

■ Executive Secretary

Oksana V. Alimkina

■ Members of Editorial Council

Konstantin V. Anokhin, Dr. Sci. (Med.), Prof., Acad. of the RAS (Moscow, Russia)

Evgeniy E. Achkasov, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Moscow, Russia)

Viktor M. Baranov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Acad. of the RAS (Moscow, Russia)

Anatoliy T. Bykov, Dr. Sci. (Med.), Prof., A.M. of the RAS (Sochi, Russia)

Vitan Vlahov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Acad. of the Bulgarian Academy of Sciences and Arts (Sofia, Bulgaria)

Mikhail I. Voevoda, Dr. Sci. (Med.), Prof., Acad. of the RAS (Novosibirsk, Russia)

Pavel A. Galenko-Yaroshevskiy, Dr. Sci. (Med.), Prof., A.M. of the RAS (Krasnodar, Russia)

Mikhail V. Dubina, Dr. Sci. (Med.), A.M. of the RAS (Saint Petersburg, Russia)

Aleksandr M. Dygay, Dr. Sci. (Med.), Prof., Acad. of the RAS (Tomsk, Russia)

Andrey L. Zefirov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Acad. of the RAS (Kazan, Russia)

Oleg I. Kit, Dr. Sci. (Med.), Prof., A.M. of the RAS (Rostov-on-Don, Russia)

Raisa S. Kuzdenbayeva, Dr. Sci. (Med.), Prof., Acad. of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan (Nur-Sultan, Kazakhstan)

Vladimir G. Kukes, Dr. Sci. (Med.), Prof., Acad. of the RAS (Moscow, Russia)

Yuriy S. Maklyakov, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Rostov-on-Don, Russia)

Nataliya Ye. Maksimovich, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Grodno, Republic of Belarus)

Gennadiy G. Matishov, Dr. Sci. (Geograph.), Prof., Acad. of the RAS (Rostov-on-Don, Russia)

Anatoliy I. Miroshnikov, Dr. Sci. (Chem.), Prof., Acad. of the RAS (Moscow, Russia)

Arkadiy N. Murashev, Dr. Sci. (Biol.), Prof. (Pushchino, Moscow Region, Russia)

Sergey V. Okovitiy, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Saint Petersburg, Russia)

Vsevolod G. Pinelis, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Moscow, Russia)

Sergey Yu. Pchelintsev, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Lyubuchany, Moscow Region, Russia)

Galina V. Ramenskaya, Dr. Sci. (Pharm.), Prof. (Moscow, Russia)

Vladimir R. Rembovsky, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Kuzmolovskiy, Leningrad Region, Russia)

Igor V. Reshetov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Acad. of the RAS (Moscow, Russia)

Dmitriy A. Sychev, Dr. Sci. (Med.), Prof., A.M. of the RAS (Moscow, Russia)

Dmitriy F. Khritinin, Dr. Sci. (Med.), Prof., A.M. of the RAS (Moscow, Russia)

Boris D. Tsygankov, Dr. Sci. (Med.), Prof., A.M. of the RAS (Moscow, Russia)

Valentina I. Tsys, Dr. Sci. (Agricuilt.), Prof., Acad. of the Russian Academy of Natural Sciences (Smolensk, Russia)

Evgenia V. Shikh, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Moscow, Russia)

Evgeniy B. Shustov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Acad. of the Russian Academy of Natural Sciences (Saint Petersburg, Russia)

JOURNAL BIOMED

Founded:	The journal has been published since 2005.
Frequency:	Quarterly
DOI Prefix:	10.33647
ISSN	2074-5982 (Print) 2713-0428 (Online)
Mass media registration certificate:	Registered at the State Committee of the Russian Federation on Press under the number ПИ № ФС77-21324 of 09.06.2005
Indexing:	The Journal is included into the Higher Attestation Commission (HAC) list of periodicals (the list of leading per-reviewed scientific journals recommended for publishing the basic research results of doctor and candidate theses)
Subscription index:	57995 in the combined catalogue "Pressa Rossii"
Price:	400 RUR
Content distribution terms:	Content is distributed under Creative Commons Attribution 4.0 License
Founders:	Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia 143442, Russian Federation, Moscow Region, Krasnogorsk District, Svetlye Gory Village, 1
Publisher:	Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia 143442, Russian Federation, Moscow Region, Krasnogorsk District, Svetlye Gory Village, 1
Editorial office:	143442, Russian Federation, Moscow Region, Krasnogorsk District, Svetlye Gory Village, 1 Tel.: +7 (495) 561-52-64 E-mail: info@scbmt.ru , scbmt@yandex.ru
Publication date:	20.10.2021

■ И ТЕХНОЛОГИИ БИОМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Р.А. Агельдинов, А.И. Левашова, В.С. Кохан, М.С. Нестеров Методические аспекты получения и характеристики липополисахаридов из клеточной культуры <i>Escherichia coli</i>	14
О.В. Алимкина, А.Э. Петренко Цитологический анализ легочного материала мышей линии C57BL/6Y при моделировании острого респираторного дистресс-синдрома	17
Т.А. Горбатенко, А.И. Веретельникова, М.А. Губина, В.Н. Максимов Молекулярно-генетические маркеры ожирения	23
А.Дж. А Дураиди, О.В. Цибизова Нанотехнологии в лечении рака	26
Д.В. Заяц, О.В. Буюклинская, О.В. Хорева Определение скорости высвобождения синтетического производного селеноксанта из мягкой лекарственной формы в опыте <i>in vitro</i>	28
П.И. Королёва, В.В. Шумянцева Разработка модельных систем на основе комплексов цитохрома P450 3A4 и рибофлавина для повышения эффективности электрокатализа	37
О.Р. Куликова, Е.А. Храмова, К.Г. Антипова, Т.Д. Пацаев, Е.С. Мороков, К.И. Луканина, В.М. Левин, Т.Е. Григорьев Ультразвуковая оценка распределения трикальцийфосфатного наполнителя по объему набухших пористых матриц на основе хитозана для биомедицинского применения	42
К.А. Курбаков, А.А. Кибиткина, Л.В. Федулова, Е.Р. Василевская, Г.С. Толмачева Генотипирование линий мышей по гену <i>TRH2</i> в рутинной практике: выбор методики выделения ДНК для проведения ПЦР	48
С.В. Максименко, Е.С. Савченко, Н.С. Огнева Культивирование эмбрионов мышей на различных питательных средах до стадии двух бластомеров после микроинъекции генно-инженерной конструкцией	53
К.И. Мелконян, Т.В. Русинова, Я.А. Козмай, А.С. Асякина Оценка элиминации ядерного материала при различных методах децеллюляризации дермы	59
Н.С. Огнева, Е.С. Савченко, Л.А. Таболякова Анестезия самок мышей при хирургической трансплантации эмбрионов	64

Н.В. Петрова, М.М. Скрипкина

Особенности организации содержания и выведения трансгенных линий мышей
в НЦБМТ ФМБА России. 70

**Н.И. Пономарева, А.П. Костюшева, С.А. Брезгин, В.В. Смирнов,
В.И. Гегечкори, Д.С. Костюшев, В.П. Чуланов**

Сравнение методов получения экзосом, используемых
в биомедицинских исследованиях 76

Е.С. Савченко, Н.С. Огнева, С.В. Максименко, О.Б. Жукова

Сравнение способов хирургической трансплантации эмбрионов мыши
псевдобеременным самкам-реципиентам 80

Н.В. Станкова, М.А. Савина

Непрямой субмаксимальный нагрузочный тест PWC170 определения
физической работоспособности на светлогорских мини-свиньях 89

■ РЕЛЕВАНТНОЕ И АЛЬТЕРНАТИВНОЕ БИОМОДЕЛИРОВАНИЕ

Л.А. Таболякова, О.В. Алимкина, Н.С. Огнева, Е.С. Савченко

Биомоделирование легочных патологий посредством интратрахеальной
инстилляций сенсibiliзирующих веществ лабораторным животным 95

■ БИОРЕГУЛЯТОРЫ В МЕДИЦИНСКИХ ТЕХНОЛОГИЯХ

**В.М. Абрамов, И.В. Косарев, Т.В. Припутневич, В.С. Хлебников, Р.Н. Василенко,
С.Ю. Пчелинцев, В.Н. Каркищенко, А.В. Мачулин, Т.Н. Абашина, В.А. Самойленко,
М.Т. Гасанов, В.Н. Уверский, А.В. Карлышев**

Направленная регуляция микробиома человека: вклад в решение
демографической проблемы в России 99

А.И. Левашова, Д.В. Хвостов, Р.А. Агельдинов, М.С. Нестеров

Идентификация компонентного состава женьшеня,
культивируемого в Республике Алтай 106

**А.В. Мачулин, И.В. Косарев, Т.Н. Абашина, В.М. Абрамов, В.Н. Уверский,
А.В. Карлышев**

Структурно-функциональные свойства термолabileного бактериоцина,
продуцируемого штаммом *Limosilactobacillus fermentum* ПЕ MD-150. 114

■ БИОМЕДИЦИНСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ В СПОРТЕ

С.Ю. Харитонов, Ю.В. Фокин

Использование оригинального прецизионного многоканального
аналогово-цифрового преобразователя в ЭЭГ-исследованиях в спорте 118

Е.Ю. Чистякова, Д.С. Лисицкий, А.Б. Верведа Экспериментальное изучение влияния производных диметиламиноэтанола на выносливость лабораторных животных	122
■ ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В БИОМЕДИЦИНЕ	
В.Е. Балакин, Т.А. Белякова, О.М. Розанова, Е.Н. Смирнова, А.Е. Шемяков, Н.С. Стрельникова Использование модели солидной формы асцитной карциномы Эрлиха у мышей для исследования ранних и отдаленных последствий гипофракционированного протонного облучения	127
А.Г. Берзина, Н.В. Станкова, А.П. Каплун, А.А. Буркова, Н.Б. Гамалея Изучение адьювантных свойств наночастиц из экстракта бересты при иммунизации мини-свиней светлогорской популяции	133
В.Ц. Болотова, Ю.Д. Болотина, Е.Б. Шустов Влияние этилтиобензимидазола фумарата на физическую работоспособность мышей в условиях одновременного гипоксического и гипертермического воздействия	139
А.В. Бунят, Д.С. Суханов Влияние эмпагифлозина на течение неалкогольной жировой болезни печени в эксперименте	144
Ю.В. Гурман, Н.С. Тропская, Т.С. Попова Изучение роли холинергических механизмов в эффектах ГАМК на электрическую активность тонкой кишки	147
М.В. Мельникова, Е.Б. Шустов, Л.Г. Кубарская, А.В. Бельская, А.А. Бондаренко, А.С. Мелехова, Е.П. Подольская, К.А. Краснов Изучение влияния биологически активных веществ бурых водорослей на стойкость эритроцитарных мембран	151
А.Л. Подолько, П.О. Бочков, Р.В. Шевченко, А.А. Литвин, Г.Б. Колыванов, В.П. Жердев Экспериментальная фармакокинетика лекарственного соединения ГЗК-111, обладающего нейропротекторной активностью	156
В.А. Приходько, Ю.И. Сысоев Седативная активность нового производного аллилморфолина у <i>Danio rerio</i> в тесте «Новый аквариум»	161

Н.С. Тропская, Ю.В. Гурман, Е.А. Кислякова, И.Г. Вилкова, Е.В. Клычникова, В.Н. Байматов, Т.С. Попова Сукцинатсодержащие препараты в коррекции морфофункциональных нарушений печени и метаболизма при экспериментальном циррозе.	165
Б.В. Шилов, А.С. Смирнов, А.Ю. Савченко Моделирование взаимодействия тиозонида и АТФазы <i>M. tuberculosis</i> методом молекулярного докинга	170
■ БИОМЕДИЦИНСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ В КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ	
А.В. Сафроненко, В.А. Косенко, Г.А. Айрапетов, И.А. Демидов, М.И. Нажева, В.М. Поляков Биоинформационный анализ уровня остеомаркеров в десневой жидкости при системном остеопорозе и местных остеодеструктивных процессах дентоальвеолярной области	176
А.В. Сафроненко, Ю.С. Макляков, С.В. Лепявка, И.А. Демидов, А.А. Демидова, И.В. Дубатова Фармакологическая оптимизация премедикации для снижения риска сердечно-сосудистых осложнений	183

■ METHODS AND TECHNOLOGIES OF BIOMEDICAL RESEARCH

Ruslan A. Ageldinov, Anna I. Levashova, Viktor S. Kokhan, Maxim S. Nesterov Methodical Aspects of Lipopolysaccharides Obtaining and Characterization from <i>Escherichia coli</i> Cells	14
Oksana V. Alimkina, Aleksandra E. Petrenko Cytological Analysis of the Lung Material of C57BL/6Y Mice in the Simulation of Acute Respiratory Distress Syndrome	17
Tamara A. Gorbatenko, Anastasia I. Veretelnikova, Marina A. Gubina, Vladimir N. Maximov Molecular Genetic Markers of Obesity	23
Abdallah Jehad Al. Duraidi, Oksana V. Tsibizova Nanotechnology in Cancer Treatment	26
Daniil V. Zayats, Olga V. Buyuklinskaya, Olga V. Horeva Determination of Selenoxanthene Synthetic Derivative Release Rate from a Soft Dosage Form at <i>in vitro</i> Experiment.	28
Polina I. Koroleva, Victoria V. Shumyantseva Design of Model Systems Based on Cytochrome P450 3A4 and Riboflavin Complexes for Increasing the Electrocatalysis Efficiency	37
Olga R. Kulikova, Elena A. Khramtsova, Kristina G. Antipova, Timofey D. Patsaev, Egor S. Morokov, Ksenia I. Lukanina, Vadim M. Levin, Timofey E. Grigoriev Ultrasonic Assessment of the Distribution of Tricalcium Phosphate Filler over the Volume of Swollen Porous Matrices Based on Chitosan for Biomedical Applications	42
Konstantin A. Kurbakov, Anastasiya A. Kibitkina, Liliya V. Fedilova, Ekaterina R. Vasilevskaya, Galina S. Tolmacheva Genotyping of Mice Lines for the <i>TPH2</i> Gene in Routine Practice: Choosing a DNA Extraction Technique for PCR.	48
Sergey V. Maksimenko, Elena S. Savchenko, Nastasya S. Ogneva Cultivation of Mice Embryos on Various Nutrient Media up to the Stage of Two Blastomers after the Microinjection of a Genetically-Engineered Construct	53
Karina I. Melkonyan, Tatyana V. Rusinova, Yana A. Kozmai, Alevtina S. Asyakina Assessment of Nuclear Material Elimination by Different Methods of Dermis Decellularization.	59
Nastasya S. Ogneva, Elena S. Savchenko, Lidiya A. Taboyakova Anesthesia of Female Mice during Surgical Embryo Transfer	64

Nataliya V. Petrova, Mariya M. Skripkina Maintenance and Breeding of Transgenic Mouse Strains at the Scientific Center of Biomedical Technologies of the FMBA of Russia	70
Natalia I. Ponomareva, Anastasia P. Kostyusheva, Sergey A. Brezgin, Valery V. Smirnov, Vladimir I. Gegechkory, Dmitry S. Kostyushev, Vladimir P. Chulanov Comparison of Exosome Isolation Methods for Biomedical Research.	76
Elena S. Savchenko, Nastasya S. Ogneva, Sergey V. Maksimenko, Olga B. Zhukova Comparison of Methods of Surgical Transplantation of Mice Embryos into Pseudopregnant Female Recipients	80
Nataliia V. Stankova, Mariya A. Savina Indirect Submaximal Load Test PWC170 for Determining Physical Performance on Svetlogorsk Mini-Pigs	89
■ RELEVANT AND ALTERNATIVE BIOMODELLING	
Lidiya A. Taboyakova, Oksana V. Alimkina, Nastasya S. Ogneva, Elena S. Savchenko Biomodeling of Pulmonary Pathologies by means of Intratracheal Instillation of Sensitizing Substances in Laboratory Animals	95
■ BIOREGULATORS IN MEDICAL TECHNOLOGIES	
Vyacheslav M. Abramov, Igor V. Kosarev, Tatiana V. Priputnevich, Valentin S. Khlebnikov, Raisa N. Vasilenko, Sergey Yu. Pchelintsev, Vladislav N. Karkischenko, Andrey V. Machulin, Tatiana N. Abashina, Vladimir A. Samoilenko, Melik T. Gasanov, Vladimir N. Uversky, Andrey V. Karlyshev Directed Regulation of the Human Microbiome: Contribution to the Solution of the Demographic Problem in Russia	99
Anna I. Levashova, Daniil V. Khvostov, Ruslan A. Ageldinov, Maxim S. Nesterov Compositional Analysis of Ginseng Cultivated in the Altai Republic.	106
Andrey V. Machulin, Igor V. Kosarev, Tatiana N. Abashina, Vyacheslav M. Abramov, Vladimir N. Uversky, Andrey V. Karlyshev Structural and Functional Properties of Thermolable Bacteriocin Produced by the <i>Limosilactobacillus fermentum</i> IIE MD-150 Strain	114
■ BIOMEDICAL TECHNOLOGIES IN SPORTS	
Sergey Yu. Kharitonov, Yuriy V. Fokin Use of an Original Precision Multichannel Analogue-Digital Converter in EEG Research in Sport. . .	118
Elizaveta Yu. Chistyakova, Dmitrii S. Lisitskii, Alexey B. Verveda Experimental Study of the Effect of Dimethylaminoethanol Derivatives on the Endurance of Laboratory Animals	122

■ PRECLINICAL RESEARCH IN BIOMEDICINE

- Vladimir E. Balakin, Tatiana A. Belyakova, Olga M. Rozanova, Elena N. Smirnova, Alexander E. Shemyakov, Nataliia S. Strelnikova**
Study of Early And Remote Effects of Hypofractionated Proton Irradiation in a Model of Solid Ehrlich Ascites Carcinoma in Mice 127
- Asya G. Berzina, Nataliya V. Stankova, Alexandr P. Kaplun, Anna A. Burkova, Nataliya B. Gamaleya**
Investigation of the Adjuvant Properties of Nanoparticles from Birch Bark Extract Used for Immunization of Mini Pigs of the Svetlogorsk Population 133
- Vera Ts. Bolotova, Yuliya D. Bolotina, Evgeniy B. Shustov**
Effect of Ethylthiobenzimidazole Fumarate on the Physical Performance of Mice under Conditions of Simultaneous Hypoxic and Hyperthermal Exposure 139
- Anna V. Bunyat, Dmitriy S. Sukhanov**
Effects of Empagliflozin on the Course of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Experiment. 144
- Yulia V. Gurman, Nataliya S. Tropskaya, Tamara S. Popova**
The Role of Cholinergic Mechanisms in the Effects of GABA on the Small Bowel Electrical Activity 147
- Margarita V. Melnikova, Evgeniy B. Shustov, Larisa G. Kubarskaya, Alisa V. Belskaya, Anastasiya A. Bondarenko, Aleksandra S. Melekhova, Ekaterina P. Podolskaya, Konstantin A. Krasnov**
Effects of Empagliflozin on the Course of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Experiment. 151
- Anna L. Podolko, Pavel O. Bochkov, Roman V. Shevchenko, Alexander A. Litvin, Gennadiy B. Kolyvanov, Vladimir P. Zherdev**
Experimental Pharmacokinetics of the GZK-111 Drug Preparation Exhibiting Neuroprotective Activity 156
- Veronika A. Prikhodko, Yuriy I. Sysoev**
Eductive Activity of a New Allylmorpholine Derivative in the Novel Tank Diving Test in Zebrafish *Danio Rerio* 161
- Nataliya S. Tropskaya, Yulia V. Gurman, Ekaterina A Kislyakova, Irina G. Vilkova, Elena V. Klychnikova, Valeriy N. Baymatov, Tamara S. Popova**
Succinate-Containing Drugs in the Correction of Morphofunctional Disorders of the Liver and Metabolism in Experimental Cirrhosis 165

Boris V. Shilov, Anton S. Smirnov, Alla Yu. Savchenko

Modeling the Interaction of Thiozonide and ATPase *M. tuberculosis* by the Method of Molecular Docking 170

■ BIOMEDICAL TECHNOLOGIES IN CLINICAL STUDIES

Andrey V. Safronenko, Vladislav A. Kosenko, Grigory A. Airapetov, Igor A. Demidov, Marina I. Nazheva, Valery M. Polyakov

Bioinformatical Analysis of the Level of Osteomarkers in the Gingival Fluid in Systemic Osteoporosis and Local Osteo-Destructive Processes in the Dentoalveolar Region. 176

Andrey V. Safronenko, Yuri S. Maklyakov, Sergey V. Lepyavka, Igor A. Demidov, Aleksandra A. Demidova, Irina V. Dubatova

Pharmacological Optimization of Premedication to Reduce the Risk of Cardiovascular Complications 183

<https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-14-16>



МЕТОДИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПОЛУЧЕНИЯ И ХАРАКТЕРИЗАЦИИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ ИЗ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ *ESCHERICHIA COLI*

Р.А. Агельдинов*, А.И. Левашова, В.С. Кохан, М.С. Нестеров

ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»
143442, Российская Федерация, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, 1

В данном исследовании была применена процедура очистки липополисахаридов из *Escherichia coli* на основе протокола горячей фенольной экстракции. Чистоту экстрагированных липополисахаридов оценивали методом ВЭЖХ-УФ. Пирогенную активность определяли с помощью *Limulus Amebocyte Lysate*-теста и использовали для мониторинга функциональности очищенных липополисахаридов. ВЭЖХ-анализ показал высокую степень чистоты, сравнимую с коммерческим липополисахаридом. Пирогенная активность подтверждала функциональную активность очищенных липополисахаридов. Представленный протокол может быть использован для выделения липополисахаридов с высокой чистотой и функциональной активностью.

Ключевые слова: *Escherichia coli*, эндотоксин, экстракция, липополисахарид, очистка

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Агельдинов Р.А., Левашова А.И., Кохан В.С., Нестеров М.С. Методические аспекты получения и характеристики липополисахаридов из клеточной культуры *Escherichia coli*. Биомедицина. 2021;17(3E):14–16. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-14-16>

Поступила 25.05.2021

Принята после доработки 25.06.2021

Опубликована 20.10.2021

METHODICAL ASPECTS OF LIPOPOLYSACCHARIDES OBTAINING AND CHARACTERIZATION FROM *ESCHERICHIA COLI* CELLS

Ruslan A. Ageldinov*, Anna I. Levashova, Viktor S. Kokhan, Maxim S. Nesterov

Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia
143442, Russian Federation, Moscow Region, Krasnogorsk District, Svetlye Gory Village, 1

In this study, a procedure was applied to purify lipopolysaccharides from *Escherichia coli* based on a hot phenolic extraction protocol. The purity of the extracted lipopolysaccharides was assessed by HPLC-UV. Pyrogenic activity was determined using the *Limulus Amebocyte Lysate* test and used to monitor the functionality of the purified lipopolysaccharides. HPLC analysis showed a high degree of purity comparable to commercial lipopolysaccharide. Pyrogenic activity confirmed the functional activity of purified lipopolysaccharides. The presented protocol can be used to isolate lipopolysaccharides with high purity and functional activity.

Keywords: *Escherichia coli*, endotoxin, extraction, lipopolysaccharide, purification

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Ageldinov R.A., Levashova A.I., Kokhan V.S., Nesterov M.S. Methodological Aspects of Obtaining and Characterization of Lipopolysaccharides from the Cell Culture of *Escherichia coli*. *Journal Biomed.* 2021;17(3E):14–16. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-14-16>

Submitted 25.05.2021

Revised 25.06.2021

Published 20.10.2021

Введение

Одним из важных компонентов внешней клеточной мембраны грамотрицательных микроорганизмов являются липополисахариды (ЛПС). Они применяются в моделированиях различных воспалительных патологических процессов, обладают выраженными токсикологическими характеристиками и специфичностью иммунологического действия [3]. Существует множество различных методик с использованием бактериальных ЛПС. Они играют основную роль при заболеваниях, вызванных грамотрицательными бактериями, а также широко используются в экспериментах, связанных со стимуляцией клеток. Это обеспечивает интерес к исследованиям, направленным на выделение, очистку и характеристику ЛПС, что подтверждается большим количеством разрабатываемых методов и протоколов [2].

По своей структуре все ЛПС состоят из трёх частей: липид А, основные олигосахариды и О-специфический полисахарид. Высоко консервативный липид А обуславливает эндотоксическую активность, в то время как олигосахариды обуславливают серологическую специфичность бактерий и отличаются среди видов [1].

Одним из наиболее распространённых методов выделения является экстракция горячим фенолом, благодаря высокому выходу продукта [4].

Целью исследования явилось использование модифицированного протокола горячей водно-фенольной экстракции, направленной на выделение ЛПС из клеток *Escherichia coli*, а также подтверждение чистоты и активности полученного продукта.

Материалы и методы

Штаммы бактерий и условия роста

5-alpha *E. coli* выращивали в бульонной среде Лурии — Бергана при 37°C в шейке-

ре-инкубаторе в течение ночи. После чего бактерии осаждали центрифугированием и использовали для экстракции ЛПС.

Экстракция и очистка ЛПС

ЛПС экстрагировали горячим фенол-водным методом с некоторыми модификациями [4]. Бактериальные суспензии центрифугировали при 10 000 g в течение 5 мин. Осадки дважды промывали в фосфатно-солевом буфере (ФСБ). Затем осадок ресуспендировали в 10 мл ФСБ и обрабатывали ультразвуком в течение 10 мин на льду. После чего к суспензии клеток в ФСБ добавляли протеинкиназу К и инкубировали в течение ночи при 37°C. На следующем этапе к смеси добавляли равный объём горячего 90% фенола с последующим энергичным встряхиванием при 65–70°C в течение 15 мин. Затем суспензии охлаждали и центрифугировали при 7000 g в течение 15 мин. Верхнюю фракцию супернатанта переносили и фенольную фазу повторно экстрагировали дистиллированной водой. Надосадочная жидкость после двух инкубаций в феноле упаривалась на роторном испарителе до минимального объёма. Конечный очищенный продукт ЛПС лиофилизировали и хранили при 4°C.

Разделение высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ)

ВЭЖХ проводили на системе Agilent 1260 Infinity. Элюция проходила на скорости потока 0,4 мл/мин и УФ-детекции при длине волны 254 нм. Разделение проводили на колонке C18 со смесью воды и ацетонитрила в качестве подвижной фазы. В качестве стандарта использовали особо чистый ЛПС из *E. coli*.

Анализ ЛПС *Limulus Amebocyte Lysate* (ЛАЛ)-тестом

Активность ЛПС определяли ЛАЛ-тестом, согласно протоколу производителя.

Результаты исследований

Профиль пиков ЛПС, экстрагированного из *E. coli*, был проанализирован и сравнен с коммерческим стандартом. Хроматограмма экспериментального очищенного ЛПС перекрывалась с хроматограммой стандарта, что указывает на высокую чистоту продукта.

При определении эндотоксинной активности с использованием реакции ЛАЛ-реактива с эндотоксином до появления жёлтого окрашивания верифицирована

функциональная активность очищенного ЛПС.

Заключение

Несмотря на то, что чистота ЛПС является важным показателем продуктивности системы выделения и очистки, функциональная активность конечного продукта также важна. В этом контексте результаты тестов на эндотоксинную активность полностью соответствуют ожиданиям по функциональной активности очищенного продукта.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Erridge C., Bennett-Guerrero E., Poxton I.R. Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes Infect.* 2002;4(8):837–851. DOI: 10.1016/s1286-4579(02)01604-0.
2. Rezania S., Amirmozaffari N., Tabarraei B., et al. Extraction, purification and characterization of lipopolysaccharide from *Escherichia coli* and *Salmonella typhi*. *Avicenna J. Med. Biotechnol.* 2011;3(1):3–9.
3. Rietschel E.T., Brade H. Bacterial endotoxins. *Sci. Am.* 1992;267(2):54–61.
4. Westphal O., Jann K. Bacterial lipopolysaccharides. Extraction with phenol-water and further applications of the procedure. In: Whistler R.L., Wolan M.L., et al. *Methods in carbohydrate chemistry*. New York: Academic press, 1965:83–91.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Агельдинов Руслан Андреевич*, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: ageldinov@gmail.com

Левашова Анна Игоревна, к.х.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: annalevashova3@gmail.com

Кохан Виктор Сергеевич, к.б.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: viktor_kohan@hotmail.com

Нестеров Максим Сергеевич, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: mdulya@gmail.com

Ruslan A. Ageldinov*, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: ageldinov@gmail.com

Anna I. Levashova, Cand. Sci. (Chem.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: annalevashova3@gmail.com

Viktor S. Kokhan, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: viktor_kohan@hotmail.com

Maxim S. Nesterov, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: mdulya@gmail.com

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

ЦИТОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЛЁГОЧНОГО МАТЕРИАЛА МЫШЕЙ ЛИНИИ C57BL/6Y ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ОСТРОГО РЕСПИРАТОРНОГО ДИСТРЕСС-СИНДРОМА

О.В. Алимкина, А.Э. Петренко*

ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»
143442, Российская Федерация, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, 1

Работа посвящена изучению изменений в клеточном составе бронхоальвеолярного лаважа с течением времени при моделировании острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) у мышей. Моделирование ОРДС осуществляли с помощью введения α -галактозилцерамида и смеси липополисахарида с полным адьювантом Фрейнда. После эвтаназии был взят бронхоальвеолярный лаваж, и на основании его анализа были выполнены графики изменения содержания общего количества лейкоцитов, процентного содержания нейтрофилов и макрофагов, из которых следует, что процентное содержание нейтрофилов в группе ОРДС статистически значимо отличается от интактных, начиная с 3 ч после моделирования ОРДС. Далее наблюдается статистически значимое снижение макрофагов.

Ключевые слова: ОРДС, бронхоальвеолярный лаваж, мыши

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Алимкина О.В., Петренко А.Э. Цитологический анализ лёгочного материала мышей линии C57BL/6Y при моделировании острого респираторного дистресс-синдрома. *Биомедицина*. 2021;17(3E):17–22. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-17-22>

Поступила 25.03.2021

Принята после доработки 16.04.2021

Опубликована 20.10.2021

CYTOLOGICAL ANALYSIS OF THE LUNG MATERIAL OF C57BL/6Y MICE IN THE SIMULATION OF ACUTE RESPIRATORY DISTRESS SYNDROME

Oksana V. Alimkina, Aleksandra E. Petrenko*

Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia
143442, Russian Federation, Moscow Region, Krasnogorsk District, Svetlye Gory Village, 1

The work is devoted to the study of changes in the cellular composition of bronchoalveolar lavage over time in the modeling of acute respiratory distress syndrome (ARDS) in mice. ARDS was modeled by administering α -galactosylceramide and a mixture of lipopolysaccharide with a complete Freud's adjuvant. After euthanasia, bronchoalveolar lavage was taken for analysis. On this basis, changes in the total number of white blood cells, the percentage of neutrophils and macrophages were assessed. It was found that the percentage of neutrophils in the ARDS group shows a statistically significant difference from that in the intact group, starting from 3 hours after modeling ARDS. Further, a statistically significant decrease in macrophages was observed.

Keywords: ARDS, bronchoalveolar lavage, mice

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Alimkina O.V., Petrenko A.E. Cytological Analysis of the lung material of C57BL/6Y Mice in the Simulation of Acute Respiratory Distress Syndrome. *Journal Biomed.* 2021;17(3E):17–22. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-17-22>

Submitted 25.03.2021

Revised 16.04.2021

Published 20.10.2021

Введение

Острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС) — воспалительный процесс в лёгких, вызванный инфекцией или другими причинами. Может возникать при вирусных и бактериальных пневмониях, тяжёлой травме [10].

ОРДС характеризуется избыточной продукцией провоспалительных цитокинов и хемокинов, массивной инфильтрацией нейтрофилов в лёгкие, эндотелиальной дисфункцией и активацией макрофагов [6, 9].

Бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ) — диагностическая процедура, предполагающая введение в лёгкие нейтрального (физиологического) раствора и удаление его с последующим изучением состава извлечённого субстрата. Процедура используется для изучения клеточного и внеклеточного содержимого пространства лёгких и дыхательных путей [1]. Методика забора смыва является достаточно простой для воспроизведения и получения данных о протекании респираторных воспалительных процессов. В целом процедура забора БАЛ лучше всего подходит для выявления ранних признаков повреждения лёгких до наступления настолько значительных изменений, что делает проблематичным извлечение лаважа [5].

Материалы и методы

Исследования проводились в НЦБМТ ФМБА России на мышцах линии C57BL/6Y массой 18–21 г, полученных из филиала «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России и прошедших 14-дневный карантин. Содержание и обращение с животными в эксперименте соответствовали требованиям приказа Минздрава России

от 01.04.2016 № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики»; правилам, принятым Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей; утверждённому письменному протоколу, в соответствии со Стандартными операционными процедурами исследователя (СОП); санитарным правилам по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев). Протокол эксперимента был одобрен биоэтической комиссией ФГБУН НЦБМТ ФМБА России.

Животные содержались в вентилируемых клетках при температуре воздуха 20–22°C, относительной влажности 40–60%, световом режиме 12:12 с включением света в 8⁰⁰. Использовался полнорационный корм ПК-120 (ООО «Лабораторкорм», Россия) при свободном доступе к водопроводной питьевой воде [2, 3, 7].

Модель острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС)

Животные были отобраны в эксперимент методом рандомизации и разделены на 2 группы по 75 особей в каждой. Животные в первой группе были интактными. Для моделирования ОРДС животным второй группы вводили ингаляционно α -галактозилцерамид в дозе 1 мкг/мышь и через 24 ч под общим наркозом вводили интратрахеально смесь липополисахарида *E. coli* в количестве 1 мг/мышь с добавлением 10 мкл/мышь полного адьюванта Фрейнда, обозначаемую как LPS [6].

В каждую временную точку — 15, 30, 45 мин; 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 18, 24,

48 и 72 ч — из эксперимента выводили по 5 животных из каждой группы. Точкой отсчёта считали последние проведённые манипуляции. Процедуру забора БАЛ проводили на животных посмертно, сразу после проведения эвтаназии, путём надреза трахеи, введением катетера с физ. р-ром (1 мл), с промывкой два раза.

На гематологическом анализаторе Mindray BC-3600 (Китай) проводилась оценка общего количества клеток в нативном лаваже. Лаваж центрифугировали, надосадочную жидкость убирали, осадок наносили на предметное стекло, далее окрашивали набором красок Лейкодиф (Чехия), а также микроскопировали для подсчёта и определения клеток.

Статистическую обработку проводили двухфакторным дисперсионным анализом (two-way ANOVA), пост тест Бонферрони, с использованием программного обеспечения GraphPad Prism. Статистически значимые результаты отмечены: ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$; **** — $p < 0,0001$.

Результаты исследований

Полученные данные представлены на рис. 1–3.

Наблюдается тенденция к повышению общего количества лейкоцитов в группе ОРДС по сравнению с интактными животными (недостаточно, $p > 0,05$).

Статистически значимое отличие группы ОРДС от интактных животных, начиная с точки 3 ч, при $p < 0,01$, а на 24 ч — при $p < 0,001$.

Начиная с 3 ч после моделирования ОРДС, наблюдается статистически значимое повышение макрофагов в группе ОРДС. Отличия достоверны при $p < 0,01$ в 3 ч, при $p < 0,0001$ — в 24, 48 и 72 ч.

Выводы

1. В ходе эксперимента статистически значимого повышения общего количества лейкоцитов не наблюдалось, следовательно, происходит процентное перераспределение лейкоцитов за счёт привлечения нейтрофилов макрофагами.

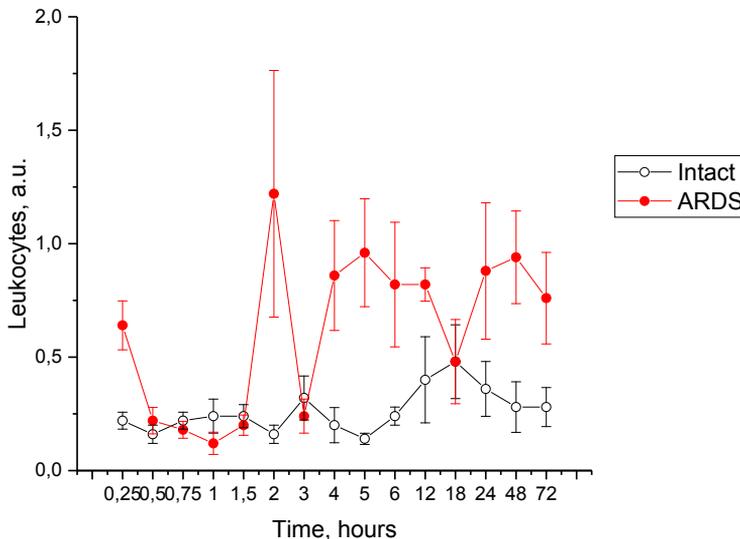


Рис. 1. Изменение общего количества лейкоцитов в БАЛ ($10^9/l$). Intact — группа интактных животных, ARDS — группа моделирования ОРДС.

Fig. 1. Change in the total number of white blood cells in BAL ($10^9/l$). Intact — group of intact animals, ARDS — group of ARDS modeling.

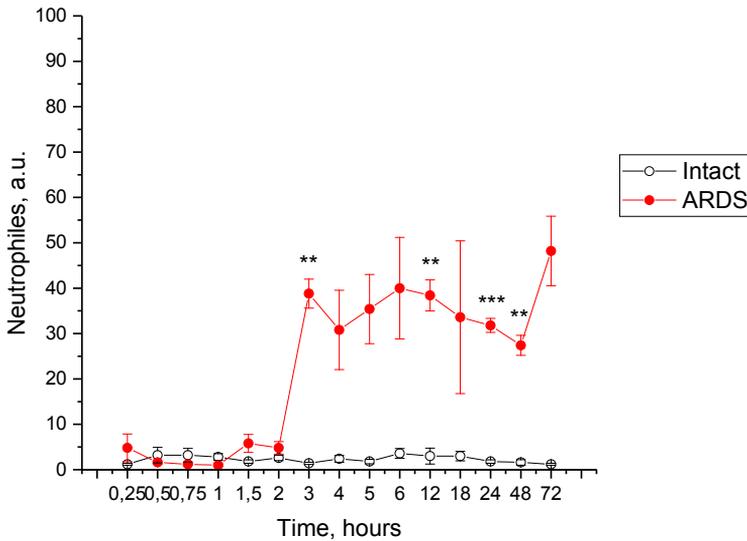


Рис. 2. Изменение содержания нейтрофилов в БАЛ (%). Intact — группа интактных животных, ARDS — группа моделирования ОРДС.

Fig. 2. Changes in the neutrophil content in BAL (%). Intact — group of intact animals, ARDS — group of ARDS modeling.

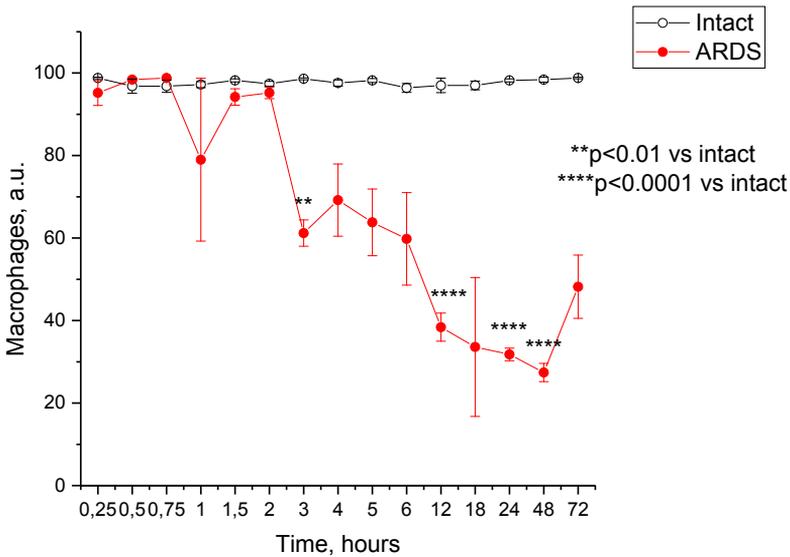


Рис. 3. Изменение содержания макрофагов в БАЛ (%). Intact — группа интактных животных, ARDS — группа моделирования ОРДС.

Fig. 3. Changes in the content of macrophages in BAL (%). Intact — group of intact animals, ARDS — group of ARDS modeling.

2. ОРДС характеризуется нерегулируемым воспалением, сопровождающимся значительным ростом уровней провоспалительных медиаторов в лёгких, таких как нейтрофилы, которые проникают в альвеолы и провоцируют гибель альвеолярных эпителиальных клеток, активацию макрофагов и альвеолярное поражение лёгких [4]. Содержащаяся в гранулах нейтрофилов эластаза разрушает сурфактант лёгких, расщепляя все 4 белка, входящие

в его состав, что приводит к потере упругости лёгких и уменьшению площади поверхности газообмена [8].

3. Доказано, что модель воспроизводит эффекты ОРДС, а анализ БАЛ является достоверным методом исследования воспалительных процессов, протекающих в лёгких, с возможностью оценки эффективности применения различных противовоспалительных препаратов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Зиновьев С.В., Селиверстов С.С., Целуйко С.С., Горбунов М.М., Семенов Д.А., Морфологическая характеристика открытого бронхоальвеолярного лаважа лёгкого крысы. *Амурский медицинский журнал*. 2015;4(12):103–108. [Zinov'ev S.V., Seliverstov S.S., Tselujko S.S., Gorbunov M.M., Semenov D.A. Morfologicheskaya kharakteristika otkrytogo bronkhoaľveol'nyarnogo lavazha legkogo krysy [Morphological characteristics of open bronchoalveolar lavage rat lung]. *Amur Medical Journal*. 2015;4(12):103–108. (In Russian)].
2. Каркищенко Н.Н. Альтернативы биомедицины. Т. 1. *Основы биомедицины и фармако моделирования*. М.: Изд-во ВПК, 2007:320. [Karkischenko N.N. *Alternativy biomeditsiny. T. 1. Osnovy biomeditsiny i farmakomodirovaniya* [Biomedicine alternatives. Vol. 1. Fundamentals of biomedicine and pharmacomodelling]. Moscow: Izdatel'stvo VPK, 2007:320. (In Russian)].
3. Каркищенко Н.Н. Основы биомоделирования. М.: Межакадемическое изд-во ВПК, 2004:607. [Karkischenko N.N. *Osnovy biomodelirovaniya* [Basics of biomodelling]. Moscow: Mezhakademicheskoe izd-vo VPK, 2004:607. (In Russian)].
4. Каркищенко В.Н., Помыткин И.А., Гасанов М.Т., Степанова О.И., Клёсов Р.А., Огнева Н.С., Савченко Е.С., Скворцова В.И. Сочетанное применение лейтрагина и лёгочного сурфактанта-БЛ повышает выживаемость животных в модели фатального острого респираторного дистресс-синдрома. *Биомедицина*. 2020;16(4):52–59. [Karkischenko V.N., Pomytkin I.A., Gasanov M.T., Stepanova O.I., Klesov R.A., Ogneva N.S., Savchenko E.S., Skvortsova V.I. Sochetannoe primeneniye leytragina i legochnogo surfaktanta-BL povyshayet vyzhivaemost' zhivotnykh v modeli fatal'nogo ostrogo respiratornogo distress-sindroma [The combined use of leytargin and pulmonary surfactant-BL increases animal survival in a model of fatal acute respiratory distress syndrome]. *Biomeditsina* [Journal Biomed]. 2020;16(4):52–59. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-16-4-52-59.
5. Матичин А.А., Кательникова А.Е., Крышень К.Л. Особенности отбора бронхоальвеолярного лаважа у лабораторных животных. *Лабораторные животные для научных исследований*. 2019;4. [Matichin A.A., Katel'nikova A.E., Kryshen' K.L. Osobennosti otbora bronkhoaľveol'nyarnogo lavazha u laboratornykh zhivotnykh [Features of selection of bronchoalveolar lavage in laboratory animals]. *Laboratornye zhivotnyye dlya nauchnykh issledovaniy* [Laboratory animals for scientific research]. 2019;4. (In Russian)]. DOI: 10.29296/2618723X-2019-04-06.
6. Помыткин И.А., Каркищенко В.Н., Фокин Ю.В., Нестеров М.С., Петрова Н.В. Модель фатального острого поражения лёгких и острого респираторного дистресс-синдрома. *Биомедицина*. 2020;16(4):24–33. [Pomytkin I.A., Karkischenko V.N., Fokin Yu.V., Nesterov M.S., Petrova N.V. Model' fatal'nogo ostrogo porazheniya legkikh i ostrogo respiratornogo distress-sindroma [A model of fatal acute lung injury and acute respiratory distress syndrome]. *Biomeditsina* [Journal Biomed]. 2020;16(4):24–33. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-16-4-24-33.
7. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях. Под ред. Н.Н. Каркищенко и др. М.: Профиль-2С, 2010:358. [*Rukovodstvo po laboratornym zhivotnym i al'ternativnym modelyam v biomeditsinskikh issledovaniyakh* [Manual on laboratory animals and alternative models in biomedical research]. Ed. by N.N. Karkischenko, et al. Moscow: Profil'-2S Publ., 2010:358. (In Russian)].
8. Kudo D., Toyama M., Aoyagi T., Akahori Y., Yamamoto H., Ishii K., et al. Involvement of high mobility group box 1 and the therapeutic effect of recombinant thrombomodulin in a mouse model of severe acute respiratory distress syndrome. *Clin. Exp. Immunol.* 2013;173(2):276–287.
9. Potey P.M., Rossi A.G., Lucas C.D., Dorward D.A. Neutrophils in the initiation and resolution of acute pulmonary inflammation: Understanding biological function and therapeutic potential. *J. Pathol.* 2019;247(5):672–685.

10. Zhao J., Li X., Gao Y., Huang W. Risk factors for the exacerbation of patients with 2019 Novel

Coronavirus: A meta-analysis. *Int. J. Med. Sci.* 2020;17(12):1744–1750.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Алимкина Оксана Владимировна, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: alimkina@scbmt.ru

Oksana V. Alimkina, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: alimkina@scbmt.ru

Петренко Александра Эдуардовна*, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: pae@scbmt.ru

Aleksandra E. Petrenko*, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: pae@scbmt.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

<https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-23-25>



МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ОЖИРЕНИЯ

Т.А. Горбатенко^{1*}, А.И. Веретельникова¹, М.А. Губина², В.Н. Максимов²

¹ ФГАОУ ВО «Новосибирский государственный университет»
630090, Российская Федерация, Новосибирская обл., Новосибирск, ул. Пирогова, 11/1

² ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр
Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН»
630090, Российская Федерация, Новосибирская обл., Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 10

В качестве молекулярно-генетического маркера ожирения исследован ген *TCF7L2* у людей с 1-й степенью ожирения. Установлена повышенная распространённость аллеля риска в исследуемой выборке по сравнению с контролем. Предполагается, что ген *TCF7L2* является фактором риска развития ранних нарушений углеводного обмена.

Ключевые слова: ожирение, диабет, полиморфизм, ген *TCF7L2*, рестрикционный анализ

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: за счёт средств Института цитологии и генетики СО РАН.

Для цитирования: Горбатенко Т.А., Веретельникова А.И., Губина М.А., Максимов В.Н. Молекулярно-генетические маркеры ожирения. *Биомедицина*. 2021;17(3E):23–25. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-23-25>

Поступила 16.04.2021

Принята после доработки 09.06.2021

Опубликована 20.10.2021

MOLECULAR GENETIC MARKERS OF OBESITY

Tamara A. Gorbatenko^{1*}, Anastasia I. Veretelnikova¹, Marina A. Gubina²,
Vladimir N. Maximov²

¹ Novosibirsk State University
630090, Russian Federation, Novosibirsk Region, Novosibirsk, Pirogova Str., 11/1

² Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the RAS
630090, Russian Federation, Novosibirsk Region, Novosibirsk, Akademika Lavrenteva Avenue, 10

The *TCF7L2* gene was studied in people with the 1st degree obesity as a molecular genetic marker of obesity. An increased prevalence of the risk allele was found in the study sample compared to the control. It is assumed that the *TCF7L2* gene is a risk factor for the development of early disorders of carbohydrate metabolism.

Keywords: obesity, diabetes, polymorphism, *TCF7L2* gene, restriction analysis

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

Funding: financed by the Institute of Cytology and Genetics of the SB RAS.

For citation: Gorbatenko T.A., Veretelnikova A.I., Gubina M.A., Maximov V.N. Molecular Genetic Markers of Obesity. *Journal Biomed*. 2021;17(3E):23–25. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-23-25>

Submitted 16.04.2021

Revised 09.06.2021

Published 20.10.2021

Введение

В настоящее время ожирение рассматривается как хроническое заболевание обмена веществ. Оно проявляется в избыточном увеличении массы тела преимущественно за счёт чрезмерного накопления жировой ткани. Предрасполагающими факторами ожирения являются стимуляция секреции инсулина, малоподвижный образ жизни, склонность к стрессам и, наконец, генетические факторы. Известно, что полиморфизм гена *TCF7L2* повышает предрасположенность к диабету 2-го типа [3] за счёт снижения продукции глюкагоноподобного пептида-1. Ожирение является одним из основных факторов развития диабета 2-го типа [2], значит можно предположить, что рассматриваемый ген *TCF7L2* является молекулярно-генетическим маркером ожирения.

Цель работы — изучение гена *TCF7L2* у людей с 1-й степенью ожирения.

Материалы и методы

Для исследования были взяты 112 человек с 1-й степенью ожирения (индекс массы тела — 30–35 [1]) и 73 человека с нормальным индексом массы тела — 20–25.

Использованные методы: полимеразная цепная реакция (ПЦР), рестрикционный анализ, электрофорез, статистические методы.

Результаты и их обсуждение

При обработке выборки с избыточной массой тела было обнаружено, что частота редкого генотипа ТТ была в два раза выше, чем у здоровых (19,6 и 9,5% соответственно). Частота гетерозигот также оказалась выше в выборке с избыточной массой тела (38,4 и 24,7% соответственно). Частота редкого аллеля Т в выборке с избыточной массой тела составила 39%, а с нормальной массой тела — 22%. В обеих выборках наблюдается соответствие Харди — Вайнберга и одинаковые значения по ожидаемой и наблюдаемой гетерозиготности. Выявлены достоверные статистические различия между выборкой с избыточной массой тела и нормальной: $P\text{-value}=0,0059$; $\chi^2=10,248$.

Выдвинута гипотеза об ассоциативности данного полиморфизма с увеличением массы тела. Частоты встречаемости аллелей и генотипов в исследуемой группе незначительно отличались от распределения в европейской популяции. Вероятно, ген *TCF7L2* является фактором риска развития ранних нарушений углеводного обмена, т. к. распространённость аллеля риска выше в исследуемой выборке, чем в контроле. Для подтверждения данной гипотезы необходимо дальнейшее исследование.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Obesity and overweight. *Newsletters of WHO*, 2018.
2. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30311716/>
3. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29993315/>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Горбатенко Тамара Александровна*, ФГАОУ ВО «Новосибирский государственный университет»;
e-mail: t200704@mail.ru

Веретельникова Анастасия Ивановна, ФГАОУ ВО «Новосибирский государственный университет»;
e-mail: veret2004.31@gmail.com

Tamara A. Gorbatenko*, Novosibirsk State University;
e-mail: t200704@mail.ru

Anastasia I. Veretelnikova, Novosibirsk State University;
e-mail: veret2004.31@gmail.com

Губина Марина Александровна, к.б.н., ФГБНУ
«Федеральный исследовательский центр
Институт цитологии и генетики Сибирского от-
деления РАН»;

e-mail: marina@bionet.nsc.ru

Максимов Владимир Николаевич, д.м.н.,
ФГБНУ «Федеральный исследователь-
ский центр Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения РАН»;

e-mail: medik11@mail.ru

Marina A. Gubina, Cand. Sci. (Biol.), Federal
Research Center Institute of Cytology and Genetics,
Siberian Branch of the RAS;

e-mail: marina@bionet.nsc.ru

Vladimir N. Maximov, Dr. Sci. (Med.), Federal
Research Center Institute of Cytology and Genetics,
Siberian Branch of the RAS;

e-mail: medik11@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

<https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-26-27>



НАНОТЕХНОЛОГИИ В ЛЕЧЕНИИ РАКА

А. Дж. А Дураиди*, О.В. Цибизова

ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет — МСХА им. К.А. Тимирязева»
127550, Российская Федерация, Москва, ул. Тимирязевская, 49

Статья посвящена описанию роли нанотехнологий в лечении рака. В статье рассмотрены понятия «нано», «нанотехнологии», «нанотерапия»; обозначены методы нанотерапии рака.

Ключевые слова: нано, нанотехнология, нанотерапия, рак

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: А Дураиди А. Дж., Цибизова О.В. Нанотехнологии в лечении рака. *Биомедицина*. 2021;17(3E):26–27. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-26-27>

Поступила 11.05.2021

Принята после доработки 17.06.2021

Опубликована 20.10.2021

NANOTECHNOLOGY IN CANCER TREATMENT

Abdallah Jehad Al. Duraidi*, Oksana V. Tsibizova

Russian State Agrarian University — Moscow Agricultural Academy named after K.A. Timiryazev
127550, Russian Federation, Moscow, Timiryazevskaya Str., 49

This article describes the role of nanotechnology in cancer treatment. Also the article deals with concepts such as “nano”, nanotechnology”, “nanotherapy”; the methods of cancer nanotherapy are indicated.

Keywords: nano, nanotechnology, nanotherapy, cancer

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Al. Duraidi A.J., Tsibizova O.V. Nanotechnology in Cancer Treatment. *Journal Biomed*. 2021;17(3E):26–27. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-26-27>

Submitted 11.05.2021

Revised 17.06.2021

Published 20.10.2021

Рак считается одним из самых серьёзных заболеваний человека. Разработка лекарств и методов лечения рака (или злокачественной опухоли) — важная и до сих пор не решённая научная задача.

С недавнего времени, говоря о лечении рака, учёные стали использовать понятия «нанотерапия», «нанотехнологии». Что такое же такое нанотехнологии и нанотерапия? Действительно ли нанотехнологии могут помочь в лечении рака? Какие методы нанотерапии рака известны на данный момент? Постараемся ответить на эти вопросы в нашей статье.

Как известно, рак, или карцинома (от древнегреч. *καρκίνος* — «рак», *ὄμα* от *ὄγκωμα* — «опухоль») — это злокачественная опухоль, заболевание, при котором клетки тела начинают бесконтрольный рост и деление и в результате превращаются в клетки с аномальными свойствами.

По данным ВОЗ, каждый год в мире от рака умирает 8–9 млн человек.

Традиционная терапия рака — хирургия, лучевая, фотодинамическая и химическая терапия — имеет сильные побочные эффекты и не всегда даёт положительный результат.

Вместе с тем нанотерапия повысила эффективность лечения рака.

Что такое «нано»? «Нано» (от лат. *nanos* — «карлик») — это термин американского физика-теоретика Ричарда Фейнмана. Этот учёный в 1959 г. во время лекции в Американском физическом обществе сказал, что «есть много пространства внутри атома», но тогда это не было принято всерьёз.

Термин «нанотехнология» (*nanotechnology*) был введён в 1974 г. японским профессором из Токио — Норио Танигучи, который определил его как «технология производства с ультрамалыми размерами ... порядка 1 нанометра...».

«Нано» — очень маленькая единица измерения: 1 м равен 1 000 000 000 нм. Например, диаметр волоса равен 0,07 мм, или 70 000 нм.

Как работают нанотехнологии при лечении рака?

Например, наночастицы металлов, благодаря своим малым размерам, свободно транспортируют химические нанопрепараты прямо к раковой опухоли. Наночастицы проникают внутрь больной клетки и поражают эту клетку, её ДНК, РНК, ферменты, рибосомы. Такие наноконструкции также могут справляться с метастазами: они свободно перемещаются в лимфатические узлы, при этом не взаимодействуют со здоровы-

ми органами, тканями и клетками, что снижает побочные эффекты лечения.

Также есть физические методы нанотерапии — например, гипертермия.

Доказано, что раковые клетки более чувствительны к нагреву, чем здоровые. Раковые клетки можно убить температурой 41–43°C. Так, наночастицы облучаются микроволнами, нагреваются, «разогревают» больную клетку и уничтожают её изнутри, как бомбы.

В настоящее время учёные работают над созданием нанороботов, которые смогут не только заниматься диагностикой заболевания, но и восстанавливать неисправности клеток на молекулярном уровне, и таким образом справляться с раком.

Так мы подошли к понятию нанотерапии рака. Оно определяется нами как ряд методов в лечении рака, в частности введение в организм человека наночастиц, которые успешно доставляют лекарство в нужную точку либо сами атакуют злокачественную опухоль и её метастазы (может быть комбинированно), а также использование нанороботов для диагностики болезни или мониторинга состояния организма человека длительное время, в будущем — для восстановления больных клеток на молекулярном уровне [1–3].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1
2. https://en.wikipedia.org/wiki/Richard_Feynman
3. <https://www.rusnor.org/pubs/articles/15932.htm>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

А Дураиди Абдаллах Джехад*, ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет — МСХА им. К.А. Тимирязева»;

e-mail: abdallah.jehad@yahoo.com

Цибизова Оксана Владимировна, к.ф.н., ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет — МСХА им. К.А. Тимирязева»;

e-mail: cibizova_o@rgau-msha.ru

Abdallah Jehad Al. Duraidi*, Russian State Agrarian University — Moscow Agricultural Academy named after K.A. Timiryazev;

e-mail: abdallah.jehad@yahoo.com

Oksana V. Tsibizova, Cand. Sci. (Phil.), Russian State Agrarian University — Moscow Agricultural Academy named after K.A. Timiryazev;

e-mail: cibizova_o@rgau-msha.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author



ОПРЕДЕЛЕНИЕ СКОРОСТИ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ СИНТЕТИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДНОГО СЕЛЕНОКСАНТЕНА ИЗ МЯГКОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ В ОПЫТЕ *IN VITRO*

Д.В. Заяц¹, О.В. Буюклинская^{2,3,*}, О.В. Хорева²

¹ ЗАО «ФАРМА-СЕВЕР»

164501, Российская Федерация, Северодвинск, ул. Георгия Седова, 4

² ФГБОУ ВО «Северный государственный медицинский университет» Минздрава России
163069, Российская Федерация, Архангельск, Троицкий просп., 51

³ ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Минздрава России

197022, Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 14, лит. А

В эксперименте была изучена скорость высвобождения синтетического производного селеноксантина (селенопирана) из мягкой лекарственной формы — 1% гель-крема с применением ячейки вертикальной диффузии. Результаты исследования показали, что в течение трёх часов из образца мягкой лекарственной формы высвобождается в среднем 77,5% от общего количества содержащегося в нём селенопирана.

Ключевые слова: скорость высвобождения, ячейка вертикальной диффузии, селенопиран

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Заяц Д.В., Буюклинская О.В., Хорева О.В. Определение скорости высвобождения синтетического производного селеноксантина из мягкой лекарственной формы в опыте *in vitro*. *Биомедицина*. 2021;17(3E):28–31. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-28-31>

Поступила 03.05.2021

Принята после доработки 28.06.2021

Опубликована 20.10.2021

IN VITRO DETERMINATION OF THE RELEASE RATE OF SELENOXANTHENE SYNTHETIC DERIVATIVE FROM ITS SOFT DOSAGE FORM

Daniil V. Zayats¹, Olga V. Buyuklinskaya^{2,3,*}, Olga V. Horeva²

¹ PHARMA-SEVER

164501, Russian Federation, Severodvinsk, Georgia Sedova Str., 4

² Northern State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia
163069, Russian Federation, Arkhangelsk, Troitskiy Avenue, 51

³ Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health Care of Russia
197376, Russian Federation, Saint Petersburg, Professora Popova Str., 14, let. A

The release rate of Selenopyran, a selenoxanthene synthetic derivative, from 1% gel-cream was studied using a vertical diffusion cell. The experimental results showed that, on average, 77.5% of Selenopyran of the total amount is released from a soft-dosage form sample within 3 hours.

Keywords: release rate, vertical diffusion cell, Selenopyran

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Zayats D.V., Buyuklinskaya O.V., Horeva O.V. Determination of Selenoxanthene Synthetic Derivative Release Rate from a Soft Dosage Form at *in vitro* Experiment. *Journal Biomed.* 2021;17(3E):28–31. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-28-31>

Submitted 03.05.2021

Revised 28.06.2021

Published 20.10.2021

Введение

Одной из важнейших характеристик, влияющих на продолжительность действия и эффективность лекарственных препаратов для местного применения, является скорость и полнота высвобождения действующего вещества. На скорость высвобождения лекарственных веществ из лекарственных форм особое влияние оказывают такие факторы, как химическая структура, физическое состояние, вспомогательные вещества, количественные характеристики, технология получения лекарственной формы [2].

В настоящее время разработано и предложено множество различных методов по определению высвобождения лекарственных веществ из мягких лекарственных форм. Эти методы можно разделить на две группы: модельные опыты *in vitro* и биологические методы *in vivo*, проводимые на живых организмах или изолированных органах.

Результаты биологических методов не всегда воспроизводимы, поэтому для сравнительных исследований применяют опыты *in vitro* [3].

В настоящее время не существует нормативных методов в фармакопеех относительно определения скорости высвобождения *in vitro* лекарственных веществ из мягких лекарственных форм (кремов, мазей, гелей, трансдермальных терапевтических систем). В связи с этим целесообразно использование ячейку вертикальной диффузии — «ячейка Франца» (T.J. Franz) [4]. Ячейка состоит из донорной камеры, содержащей испытуемый образец, и камеры высвобождения, содержащей рецепторную среду, разделённые мембраной, предназначенной для диффузии и высо-

бождения действующего вещества тест-пробы и обеспечивающей контакт с рецепторной средой. Как правило, в течение 3-часового периода отбираются 3 образца, которые анализируются с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии или другого подходящего метода.

Цель работы — определение скорости высвобождения синтетического производного селеноксанта — 9-фенилсимметричного октагидроселеноксанта (селенопирана) из мягкой лекарственной формы с использованием метода вертикальной диффузии.

Материалы и методы

Объектом исследования является гель-крем, содержащий 1% селенопирана, разработанный на кафедре фармации и фармакологии ФГБОУ ВО «Северный государственный медицинский университет» Минздрава России [1].

Для определения скорости высвобождения селеноксанта из лекарственной формы применяли метод вертикальной диффузии. В эксперименте использовалась система вертикальной диффузии, состоящая из магнитной мешалки с нагревателем НДТ1 для одиночной ячейки вертикальной диффузии (Copley Scientific, Великобритания) и вертикальной диффузионной ячейки 11,28 мм×6,5 мл типа «В» (стекло) (Copley Scientific, Великобритания). В качестве модели кожи использовали мембрану Tuffryn из полисульфона диаметром 25 мм (Copley Scientific, Великобритания). Для отбора проб из ячейки применяли шприц Люер с пробоотборной трубкой.

На мембрану в камеру для образца помещали 0,2 г 1% геля-крема селеноксантина (точная навеска, содержащая 2 мг селеноксантина) таким образом, чтобы мембрана контактировала с тестируемой средой при надетом сверху пружинном зажиме, подготовленном ранее. Мембрану предварительно увлажняли раствором, использующимся в качестве приёмной среды.

Далее ячейку заполняли рецепторным раствором. В качестве приёмной среды использовали спирт этиловый 95%, предварительно нагретый до 32°C. Объём приёмной среды в ячейке доводили до метки, контролируя при этом отсутствие пузырьков газа.

Ячейку помещали в держатель магнитной мешалки, вода в которой предварительно нагревалась до температуры 32°C. Для равномерной диффузии препарата в рецепторную среду активировали магнитную мешалку, которая обеспечивала постоянное перемешивание содержимого приёмной камеры ячейки вертикальной диффузии.

Отбор проб осуществляли 3 раза: через 30 мин после начала эксперимента, через 1,5 ч и через 3 ч. При помощи микропипетки 50 мкл пробы помещали в мерную колбу вместимостью 5 мл и доводили спиртом этиловым до метки (испытуемый раствор).

После отбора пробы объём рецепторной среды в ячейке доводили до метки спиртом этиловым 95%.

Содержание активного вещества (мг/мл) в приёмной среде определяли при помощи однолучевого спектрофотометра УФ-видимого диапазона с контролем светового потока НТАСНУ-5100 по методике, разработанной на кафедре фармации и фармакологии ФГБОУ ВО СГМУ [1]. Количество вещества (X , мг), высвободившегося из ле-

карственной формы в приёмную среду, рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{C * 5 * 6,5}{0,05}$$

где C — концентрация селеноксантина в исследуемом растворе, мг/мл; 6,5 — объём рецепторной камеры в ячейке вертикальной диффузии, мл; 0,05 — объём аликвоты, отбираемый из пробы, мл; 5 — объём разведения аликвоты, мл.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием пакета прикладных программ STATA. Рассчитывали среднее значение по результатам шести измерений, а также стандартное отклонение от среднего.

Результаты исследований

На рисунке представлена зависимость количества высвободившегося в приёмную среду селеноксантина от времени эксперимента.

За 30 мин из лекарственной формы высвобождалось 47,3% активного вещества. С течением времени скорость высвобождения снижалась, и через 1,5 ч в приёмной среде было зафиксировано 66,4% от общего количества селеноксантина. Через 3 ч из лекарственной формы всего высвободилось 77,5% действующего вещества.

Выводы

Из мягкой лекарственной формы гелем-крем за 3 ч высвобождается 77,5% действующего вещества. Для поддержания терапевтической концентрации препарата в области применения можно рекомендовать нанесение на кожу геля-крема с содержанием 1% селенопирана каждые 6 ч, т. е. 4 раза в сутки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Заяц Д.В. Разработка и оптимизация методики количественного определения синтетического производного селеноксантина методом спектрофотометрии. Гармонизация подходов к фармацевтической разра-

ботке. *Сб. тез. II Межд. науч.-практ. конф.* Москва: РУДН, 2019:123–126. [Zayats D.V. Razrabotka i optimizatsiya metodiki kolichestvennogo opredeleniya sinteticheskogo proizvodnogo selenoksantena metodom



Рис. Зависимость количества высвободившегося в приёмную среду селеноксантина от времени эксперимента.
Fig. Dependence of the amount of selenoxanthene released into the receiving medium on the time of the experiment.

спектрофотометрии. Гармонизация подходов к фарматевтической разработке [Development and optimization of assay method of a selenoxanthene synthetic derivative by spectrophotometry. Harmonization of approaches to pharmaceutical development]. *Sb. tez. II Mezhd. nauch.-prakt. konf. [A collection of abstracts of the II International Scientific and Practical Conference]*. Moscow: RUDN Publ., 2019:123–126. (In Russian)].

2. Милованова Л.Н. *Технология изготовления лекарственных форм*. Ростов-на-Дону: Медицина, 2017:448. [Milovanova L.N. *Tekhnologiya izgotovleniya lekarstvennykh form [Manufacturing technol-*

ogy of drug forms]. Rostov-on-Don: Medicina Publ., 2017:448. (In Russian)].

3. Перцев И.М., Зупанц И.А. *Фармацевтические и медико-биологические аспекты применения лекарственных средств*. Харьков: УкрФА, 2013:461. [Pertsev I.M., Zupants I.A. *Farmatsevticheskie i mediko-biologicheskie aspekty primeneniya lekarstvennykh sredstv [Pharmaceutical and biomedical aspects of drugs using]*. Kharkov: UkrPhA Publ., 2013:461. (In Russian)].

4. Heinrich L.A., Pajaziti B., Roziev R. Drug delivery system of a radio-protective inclusion Complex. *Advanced Materials Research*, 2014;872:231–236.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Зяец Даниил Владимирович, ЗАО «ФАРМА-СЕВЕР»;

e-mail: zayatsdanil@yandex.ru

Буюклинская Ольга Владимировна*, д.м.н., доц.; ФГБОУ ВО «Северный государственный медицинский университет» Минздрава России; ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России;

e-mail: obfarm@mail.ru

Хорева Ольга Владимировна, к.м.н., доц., ФГБОУ ВО «Северный государственный медицинский университет» Минздрава России;

e-mail: khoreva69@mail.ru

Daniil V. Zayats, PHARMA-SEVER;

e-mail: zayatsdanil@yandex.ru

Olga V. Buyuklinskaya*, Dr. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Northern State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia; Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health Care of Russia;

e-mail: obfarm@mail.ru

Olga V. Horeva, Cand. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Northern State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia;

e-mail: khoreva69@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

ПРАВИЛА НАПРАВЛЕНИЯ, РЕЦЕНЗИРОВАНИЯ И ОПУБЛИКОВАНИЯ РУКОПИСЕЙ НАУЧНЫХ РАБОТ В ЖУРНАЛЕ «БИОМЕДИЦИНА»

1. Порядок направления и опубликования рукописей в рецензируемом издании

1.1. Журнал «Биомедицина» публикует научные работы экспериментального и учебно-методического плана, не публиковавшиеся ранее в других изданиях, а также обзоры по предложению редакционного совета. Печатаются статьи, посвящённые биологическому моделированию, обеспечению репрезентативности, воспроизводимости и экстраполяции на человека данных, полученных в биомедицинских экспериментах на животных. Приоритет отдаётся статьям по разработке и внедрению новых биомедицинских методов и технологий. Публикуются работы по конструированию и внедрению в лабораторную практику новых видов животных-моделей (трансгенных, нокаутных), представляющих ценность для биомедицинских исследований, а также их генетической, эпигенетической, микробиологической стандартизации в соответствии с рекомендациями GLP, GMP, GCP и российскими нормативами. Уделяется внимание научным трудам, посвящённым экспериментальной и спортивной фармакологии, фармнутриентам, восстановительной медицине и биомедицинским аспектам клинической фармакологии.

1.2. Рубрикация журнала:

- Обзор — проблемная статья, содержащая авторский анализ результатов научно-методологических исследований по актуальной биомедицинской тематике (максимальный объём рукописи — до 12 стр., максимальное количество ссылок — до 50).
- Оригинальная статья — труд, отражающий результаты завершённых исследований (до 10 стр., до 25 ссылок).
- Краткое сообщение — завершённый фрагмент работы, представляющий самостоятельный интерес (до 4 стр., до 15 ссылок).
- Практикум — учебно-методическая работа, описывающая используемые в биомедицине методики, новые технологии (до 6 стр., до 10 ссылок).

1.3. Актуальные разделы журнала:

- Методы и технологии биомедицинских исследований;
- Релевантное и альтернативное биомоделирование;
- Генетика и эпигенетика животных-биомоделей;
- Доклинические исследования в биомедицине;
- Биомедицинские технологии в клинических исследованиях;
- Биорегуляторы в медицинских технологиях;
- Биомедицинские технологии в спорте.

1.4. Общие требования к оформлению

1.4.1. Статью следует представлять в двух экземплярах с печатной и электронной версией текста, набранной в программе Microsoft Word шрифтом Times New Roman, кегль 12 на одной стороне листа с интервалом 1 между строками и полями 2,5 см со всех сторон. Нумерация страниц — сверху по центру (на первой странице номер не проставляется).

1.4.2. На первой странице следует указать:

- предполагаемый раздел журнала;
- название работы;
- инициалы и фамилии авторов;

- названия учреждений, в которых была проведена работа, их полные адреса с почтовыми индексами.

Далее печатается реферат (не более 250 слов) и ключевые слова (не более 6 слов). Затем — информация о конфликте интересов, об источниках финансирования работы, благодарности (при наличии).

Название работы, ФИО авторов, названия учреждений и адреса, реферат и ключевые слова, информация о конфликте интересов, об источниках финансирования работы, благодарности (при наличии) переводятся на английский язык.

Латинские названия по тексту должны быть выделены *курсивом*.

1.4.3. В конце статьи приводится список цитированной литературы (см. п. 1.4.10 «Литература»), осуществляется его транслитерация и перевод на английский язык (раздел «References», согласно требованиям «Scopus»), проставляются собственноручные подписи всех авторов рукописи.

На последнем листе печатаются сведения об авторах — ФИО (полностью) всех авторов, место работы каждого (название учреждения), учёная степень и звание (при наличии), адрес электронной почты.

Отдельно указывается автор (символом * после фамилии), ответственный за переписку, и его мобильный телефон (только для связи с редакцией, не публикуется).

Сведения об авторах переводятся на английский язык.

1.4.4. К рукописи прилагают сопроводительное письмо от учреждения, направившего работу, содержащее разрешение на публикацию в открытой печати (или копию экспертного заключения).

1.4.5. Статьи, написанные по результатам экспериментальных исследований, должны (если это возможно) строиться по схеме: «Введение», «Материалы и методы», «Результаты исследований», «Обсуждение результатов», «Выводы», «Список литературы». Для работ, предназначенных для рубрики «Краткие сообщения», раздел «Обсуждение результатов» необязателен, а количество литературных ссылок должно быть минимальным. Форма изложения обзорных и теоретических статей — свободная.

1.4.6. Статьи, описывающие исследования, выполненные на экспериментальных животных или альтернативных биологических объектах, в разделе «Материалы и методы» должны содержать следующую информацию: организм, орган, ткань, клеточная культура, микробная культура, субклеточный, молекулярный уровень экспериментальных объектов.

В тех работах, где были использованы лабораторные животные, следует указать:

- биологический вид;
- пол;
- возраст;
- массу животного;
- генетический статус: инбредные линии, популяции нелинейных животных, гибриды, генетически модифицированные организмы (трансгенные, нокаутные);
 - источник, откуда получены животные;
 - микробиологический статус: гнотобиоты, SPF, конвенциональные;
 - условия содержания: виварий, изолятор, барьерная система, тип клеток, плотность посадки животных, режим кормления и поения.

1.4.7. Статистическая обработка результатов и таблицы

Таблицы должны содержать только обобщённые и статистически обработанные материалы исследования. Следует указать метод обработки результатов и необходимые для расчётов исходные данные. Информация, представленная в таблицах, не должна повторяться в тексте статьи. Таблицы должны быть пронумерованы и озаглавлены. В тексте в круглых скобках дается ссылка на них, например: (табл. 1).

Порядковые номера и названия таблиц, а также примечания (при наличии) переводятся на английский язык.

1.4.8. Иллюстративный материал

Рисунки не должны дублировать материалы таблиц. Все обозначения на них необходимо сопровождать пояснениями в подписи к рисунку. Иллюстрации следует пронумеровать в порядке их упоминания в тексте. Для микрофотографий полагается указать способ фиксации образцов и увеличение.

Требования к иллюстрациям:

- чёрно-белая и цветная графика — разрешение: не менее 300 точек на дюйм, стандартные форматы (TIFF, GIF, JPEG, PNG);
- диаграммы и графики (векторные изображения) представляются в собственном формате программ построения (Adobe, Excel и т.д.) с приложением исходных (табличных) данных, по которым построены графики/диаграммы.

Порядковые номера и названия рисунков, а также примечания (при наличии) переводятся на английский язык.

1.4.9. Сокращения

Помимо общепринятых, допускается использование не более трёх сокращений терминов, с обязательным указанием полного названия (в скобках) при первом упоминании в тексте.

1.4.10. Литература

Цитируемая в статье литература приводится общим списком в конце статьи в алфавитном порядке (вначале — на русском, затем — на иностранных языках). Ссылки на цитируемую литературу в тексте статьи отмечаются порядковым номером работы в списке литературы, заключённым в квадратные скобки. Фамилии иностранных авторов при первом упоминании в тексте указываются (если это необходимо) на языке оригинала.

В списке литературы приводятся:

- для книг: фамилии и инициалы всех авторов, название, место издания, название издательства, год издания, цитируемые страницы, либо общее количество страниц в книге (если текст статьи содержит несколько ссылок на данную книгу).

Пример:

1. Каркищенко В. Н., Каркищенко Н. Н., Шустов Е. Б. *Фармакологические основы терапии*. Тезаурус. Изд. 3-е — новая ред. М., СПб: Айсинг, 2018:288.

References:

1. Karkischenko V.N., Karkischenko N.N., Shustov E.B. *Farmakologicheskie osnovy terapii [The pharmacological therapeutics basis]*. Tezaurus. Izd. 3-e — novaya red. [Thesaurus. Ed. 3-e — new ed.]. Moscow, Saint-Petersburg: Ajsing Publ., 2018:288. (In Russian).

- для главы (статьи) в книге: фамилии и инициалы авторов главы, название главы, название книги, фамилии и инициалы редакторов, место издания, название издательства, год издания, первая и последняя страницы главы.

Пример:

2. Сарвилина И. В., Каркищенко В. Н., Горшкова Ю. В. Современные технологические платформы для геномных и протеомных исследований. В кн.: *Междисциплинарные исследования в медицине*. М.: Техносфера, 2007:34–67.

References:

2. Sarvilina I. V., Karkischenko V. N., Gorshkova Yu. V. *Sovremennyye tekhnologicheskie platformy dlya genomnyh i proteomnyh issledovaniy [Modern technological platforms for genomic and proteomic research]*. V kn.: *Mezhdisciplinarnye issledovaniya v medicine* [In the book: *Interdisciplinary research in medicine*]. Moscow: Tekhnosfera Publ., 2007:34–67. (In Russian).

- для статьи в журнале: фамилии и инициалы авторов, название статьи, наименование журнала, год, том (выпуск), номер, первая и последняя страницы статьи.

Пример:

3. Каркищенко В. Н., Помыткин И. А., Скворцова В. И. Опиоидэргическая система иммунных клеток: новая фармакологическая мишень в терапии «цитокинового шторма». *Биомедицина*. 2020;16(4):14–23. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-16-4-14-23>.

References:

3. Karkischenko V.N., Pomytkin I.A., Skvortsova V.I. Opioidergicheskaya sistema immunnykh kletok: novaya farmakologicheskaya mishen' v terapii «tsitokinovogo shtorma» [The Opioidergic System of Immune Cells: a New Pharmacological Target in the Therapy of “Cytokine Storm”]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2020;16(4):14–23. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-16-4-14-23>. (In Russian).

- для сайта: ссылка на страницу в сети Интернет.

Пример:

<http://www.nih.gov/science/models/mouse/knockout/index.html>.

1.5. Корректур

Рукописи, не отвечающие перечисленным правилам, не рассматриваются и не возвращаются. Редакция оставляет за собой право принимать решение о публикации рукописи, производить редакционные изменения и сокращения, стилистическую правку, а также переносить статью в другой раздел журнала. Все рукописи направляются на внешнее рецензирование.

1.6. За публикацию статей плата не взимается и гонорар не выплачивается. После опубликования статьи авторам высылается бесплатно один экземпляр журнала.

1.7. Адрес редакции

- Почтовый адрес: 143442, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, влд. 1. НЦБМТ ФМБА России, редакция журнала «Биомедицина»

- Электронные адреса:

ФГБУН НЦБМТ ФМБА России — info@scbmt.ru; scbmt@yandex.ru

отв. секретарь редакции Алимкина Оксана Владимировна — alimkina@scbmt.ru

- Подача рукописей возможна через сайт журнала — journal.scbmt.ru

1.8. Сроки опубликования работ

Максимальный срок между датами поступления рукописи в редакцию и опубликования в журнале составляет 12 месяцев. Уведомление авторов в случае отклонения статьи при предварительном рассмотрении по причине явного несоответствия работы тематике журнала происходит в течение трех месяцев после поступления рукописи в редакцию.

2. Порядок рецензирования статей, направленных в редакцию рецензируемого издания

2.1. Все статьи, поступившие в редакцию, проходят независимое рецензирование.

2.2. Рукопись научной статьи, поступившая в редакцию журнала «Биомедицина», рассматривается ответственным секретарём на предмет соответствия профилю журнала, требованиям к оформлению, регистрируется. Отв. секретарь направляет статью на рецензирование одному или, при необходимости, двум рецензентам.

2.3. Для проведения рецензирования рукописей статей в качестве рецензентов могут привлекаться как члены редакционного совета журнала «Биомедицина», так и высококвалифицированные учёные и специалисты других организаций и предприятий, обладающие глубокими профессиональными знаниями и опытом работы по конкретному научному направлению (как правило, доктора наук, профессора) и имеющие публикации по тематике рецензируемой статьи в течение последних трёх лет.

2.4. Рецензенты уведомляются о том, что присланные им рукописи являются частной собственностью авторов и относятся к сведениям, не подлежащим разглашению. Рецензентам не разрешается делать копии статей для своих нужд. Рецензирование проводится конфи-

денциально (одностороннее «слепое»). Нарушение конфиденциальности возможно только в случае заявления рецензента о недостоверности или фальсификации материалов, изложенных в статье.

2.5. К рецензированию не привлекаются специалисты, работающие в том же учреждении, где выполнена работа.

2.6. Если в рецензии на статью имеется указание на необходимость её исправления, то статья направляется автору на доработку. В этом случае датой поступления в редакцию считается дата возвращения доработанной статьи.

2.7. Статья, направленная автору на доработку, должна быть возвращена в исправленном виде в течение месяца. К переработанной рукописи необходимо приложить письмо от авторов, содержащее ответы на все замечания и поясняющее все изменения, сделанные в статье.

2.8. Если статья по рекомендации рецензента подверглась значительной авторской переработке, она направляется на повторное рецензирование тому же рецензенту, который сделал критические замечания.

2.9. Редакция оставляет за собой право отклонения статей в случае неспособности или нежелания автора учесть пожелания редакции.

2.10. При наличии отрицательных рецензий на рукопись от двух разных рецензентов или одной рецензии на её доработанный вариант статья отвергается без рассмотрения другими членами редсовета.

2.11. В случае несогласия с мнением рецензента автор статьи имеет право предоставить аргументированный ответ в редакцию журнала. Статья может быть направлена на повторное рецензирование либо на согласование в редакционный совет.

2.12. Решение о целесообразности публикации после рецензирования принимается главным редактором, а при необходимости — редсоветом в целом.

2.13. Ответственный секретарь доводит до сведения автора принятое решение. Максимальный срок рецензирования между датами поступления рукописи в редакцию и вынесения решения составляет два месяца.

2.14. Каждая конкретная статья требует индивидуального подхода к выбору критериев её оценки. При этом в рецензии следует отразить:

- соответствие материала, изложенного в статье, профилю журнала;
- актуальность содержания статьи: соответствует ли уровень изложенного в ней материала современным достижениям науки и техники;
- значимость полученных результатов исследований (научных, практических);
- качественную и/или количественную оценку приведённого в статье материала (фактического, иллюстрационного);
- полноту и достоверность приводимых сведений;
- правильность и точность используемых (или вводимых) определений и формулировок;
- оценку литературного стиля изложения материала;
- обоснованные выводы о статье в целом, замечания, при необходимости — рекомендации по её улучшению.

В заключительной части рецензии по результатам анализа статьи должна быть дана чёткая рекомендация об её публикации в представленном виде, либо о необходимости её доработки или переработки (с конструктивными замечаниями), а может быть, и о нецелесообразности её издания в данном журнале.

2.15. Редакция издания направляет авторам представленных материалов копии рецензий или мотивированный отказ, а также обязуется направлять копии рецензий в Министерство науки и высшего образования РФ при поступлении соответствующего запроса.

2.16. Оригиналы рецензий хранятся в редакции и издательстве в течение пяти лет со дня публикации статей.

<https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-37-41>



РАЗРАБОТКА МОДЕЛЬНЫХ СИСТЕМ НА ОСНОВЕ КОМПЛЕКСОВ ЦИТОХРОМА P450 3A4 И РИБОФЛАВИНА ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЭЛЕКТРОКАТАЛИЗА

П.И. Королёва*, В.В. Шумянцева

*ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича»
119121, Российская Федерация, Москва, ул. Погодинская, 10, стр. 8*

Цитохромы P450 (CYP) — обширный класс ферментов, активным центром которых является гем типа b. Основная функция цитохромов P450 заключается в биотрансформации эндогенных и экзогенных соединений в организме.

Цитохром P450 3A4 метаболизирует порядка 50% всех лекарственных соединений, поэтому изучение его каталитических свойств представляет большой интерес. Эффективным инструментом в исследовании цитохромов P450 является создание электрохимических систем, где на твёрдом носителе — электроде — с помощью модификатора иммобилизуется фермент. Электроны в таком случае поступают с электрода, заменяющего природный донор электронов НАД (Ф)Н и ограничивающего необходимость использования редокс-партнёрных белков. Задача модификатора электрода — сохранение каталитической активности фермента, а также повышение эффективности электронного транспорта при включении наночастиц благородных металлов или углеродных материалов.

Цель работы — создание более эффективных цитохром P450 электрохимических систем для увеличения выхода метаболитов ферментативных электрокаталитических реакций.

Ключевые слова: цитохром P450, биоэлектрохимия, рибофлавин, электрокатализ

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 гг.).

Для цитирования: Королёва П.И., Шумянцева В.В. Разработка модельных систем на основе комплексов цитохрома P450 3A4 и рибофлавина для повышения эффективности электрокатализа. *Биомедицина*. 2021;17(3E):37–41. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-37-41>

Поступила 15.04.2021

Принята после доработки 13.05.2021

Опубликована 20.10.2021

DESIGN OF MODEL SYSTEMS BASED ON CYTOCHROME P450 3A4 AND RIBOFLAVIN COMPLEXES FOR INCREASING THE ELECTROCATALYSIS EFFICIENCY

Polina I. Koroleva*, Victoria V. Shumyantseva

*Research Institute of Biomedical Chemistry named after V.N. Orekhovich
119121, Russian Federation, Moscow, Pogodinskaya Str., 10, Building 8*

Cytochromes P450 (CYP) are a large class of enzymes, whose active site is type b heme. The main function of cytochromes P450 is biotransformation of endogenous and exogenous compounds in the organism. The cytochrome P450 3A4 metabolizes about 50% of all modern medications; therefore, its catalytic properties present significant research interest. P450 cytochromes can be effectively investigated using

electrochemical systems that consist of a solid base (electrode) and a modifier facilitating enzyme immobilization. In this case, the electron donor is an electrode substituting a natural electron donor NAD(P)H and eliminating the need to use redox-partner proteins. The electrode modifier maintains the catalytic enzyme activity and enhances the efficiency of electron transfer when noble metals and carbon materials nanoparticles are included. This work is aimed at creating more effective cytochrome P450 electrochemical systems to increase the yield of metabolites of enzymatic electrocatalytic reactions.

Keywords: cytochrome P450, bioelectrochemistry, riboflavin, electrocatalysis

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

Funding: the work was performed under the Russian Federation fundamental research program for the long-term period of 2021–2030.

For citation: Koroleva P.I., Shumyantseva V.V. Design of Model Systems Based on Cytochrome P450 3A4 and Riboflavin Complexes for Increasing the Electrocatalysis Efficiency. *Journal Biomed.* 2021;17(3E):37–41. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-37-41>

Submitted 15.04.2021

Revised 13.05.2021

Published 20.10.2021

Введение

Перенос электронов в цитохром P450-системах осуществляется в соответствии со схемой: НАД(Ф)Н → НАД(Ф)Н-зависимая цитохром P450 редуктаза (CPR) (ФАД (флавинадениндинуклеотида), ФМН (флавинаденинмононуклеотид)) → цитохром P450 (Fe³⁺). Особенностью катализа цитохромов P450 является образование не только метаболита органического субстрата (гидроксилирование или N-деметилирование), но и генерация активных форм кислорода.

Цитохромы P450 для проявления каталитических свойств нуждаются в реконструкции системы передачи электронов, в которую входят редокс-партнёрные белки, эту необходимость устраняют электрохимические ферментные системы, в которых донором электронов является непосредственно электрод.

Разработка электрохимических систем для исследования свойств цитохромов P450 ставит перед собой такие проблемы, как использование минимального количества белка, сохранение нативной конформации и каталитической активности фермента. Для повышения эффективности цитохром P450-зависимого электрокатализа разработаны следующие подходы.

Обоснованный выбор модификации электродов является одним из основных факторов успешного электрокатализа. В качестве модификаторов могут использоваться такие материалы, как углеродные нанотрубки, наночастицы благородных металлов и мембраноподобные вещества [1]. Так, нами было показано, что использование для модификации электродов углеродных нанотрубок увеличивает количество электроактивного фермента с 5% для ДДАБ/ПГЭ до 45% для УНТ/ПГЭ, (ПГЭ — печатный графитовый электрод; ДДАБ — дидодецилдиметиламмоний бромид, УНТ — углеродные нанотрубки), что может быть использовано для идентификации этих гемопротеинов в биологическом материале. Однако для проявления каталитических свойств цитохромов P450 более эффективны модификации липидоподобными соединениями (например, ДДАБ) [1].

Другим подходом является увеличение количества иммобилизуемого белка или создание комплексов белка и электроактивных кофакторов в роли переносчиков электронов, например рибофлавина [8], ФМН и ФАД или создание сложных белковых комплексов с CPR и цитохромом b5 [2], создание «химерных» конструкций с совмещением гемового и флавинового доменов [7, 5].

Материалы и методы

В работе использовали трёхконтактные электроды, полученные методом трафаретной печати с графитовыми рабочим и вспомогательным электродами и хлор-серебряным электродом сравнения (ПГЭ) («КолорЭлектроникс», Россия). Диаметр рабочего электрода — 0,2 см (площадь — 0,0314 см²). Все потенциалы приведены относительно хлоридсеребряного электрода сравнения (Ag/AgCl). Рекомбинантный цитохром P450 3A4 человека (142 мкМ) в 550 мМ калий-фосфатном буфере, pH 7,2, содержащем 0,2% CHAPS, 1 мМ дитиотреитол и 20% глицерин (по объёму), получен и выделен по методике, представленной в работе [6]. Концентрацию фермента определяли спектрофотометрически по образованию комплекса восстановленной формы с монооксидом углерода; коэффициент поглощения $\epsilon_{450-490} = 91 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$. В работе были использованы следующие реактивы: ацетат аммония, ацетилацетон, дидодецилдиметиламмония бромид, хлороформ, эритромицин, рибофлавин («Sigma-Aldrich», США); гидроксид калия, дигидрофосфат калия, хлорид натрия («Спектр-Хим», Россия); уксусная кислота («Fisher Scientific», США).

Электрохимические исследования проводили с помощью потенциостата Autolab302N («Metrohm Autolab», Нидерланды), снабжённого программным обеспечением NOVA (версия 2.0).

Спектральные исследования проводили с помощью спектрофотометра Cary 100 Scan UV-Vis («Agilent», Нидерланды) и программного обеспечения Cary Win UV.

Для модификации поверхности электрода на ПГЭ наносили 1 мкл 0,1 М ДДАБ в хлороформе (10 мин, 20°C). В работе были использованы нековалентные комплексы цитохром P450 3A4: рибофлавин в соотношении 1:1 и 1:10. Ферментные электроды выдерживали при температуре 4°C 12 ч во влажной камере.

Перед началом всех электрохимических измерений электроды инкубировали в электролитном буфере (0,1 М калий-фосфатный буфер, pH 7,4, содержащий 0,05 М NaCl) в течение 10 мин, 20°C. Параметры регистрации циклических вольтамперограмм (ЦВА): диапазон потенциалов — от 0 до -0,6 В (отн. Ag/AgCl), скорость развёртки потенциала — 100 мВ/с.

Для сравнения влияния различных условий модификаций фермента на N-деметилазную активность цитохрома P450 3A4 по отношению к эритромицину электрокаталитические реакции проводили в электролитном буфере с помощью ферментного электрода в присутствии 100 мкМ эритромицина при контролируемом потенциале рабочего электрода -0,5 В (отн. Ag/AgCl) в течение 20 мин. Анализ скорости реакции N-деметилирования эритромицина проводили путём регистрации образования формальдегида [4].

Результаты и их обсуждение

Для исследования влияния рибофлавина на каталитическую активность цитохрома P450 3A4 была выбрана система, в которой цитохром P450 3A4 и рибофлавин находились в соотношениях 1:1 и 1:10 соответственно. Соотношение 1:1 моделирует микросомальную систему с эквимольными количествами P450 3A4 и CPR [3]. Было исследовано также соотношение цитохром P450 3A4:рибофлавин 1:10.

Электрохимические параметры цитохрома P450 3A4 и комплексов цитохром P450 3A4 рибофлавин (1:1 и 1:10) приведены в таблице.

В результате цитохром P450-зависимой реакции N-деметилирования антибиотика из группы макролидов эритромицина образуется формальдегид, концентрацию которого определяли спектрофотометрически

[1]. Сравнительная каталитическая активность систем приведена в таблице.

Можно предположить, что рибофлавин стабилизирует цитохром P450 3A4 за счёт образования комплекса, моделирующего микросомальную монооксигеназную систему. Кроме того, рибофлавин может служить диффузионным медиатором электронного транспорта в электрохимической цитохром P450-системе. Возможна также роль рибофлавина, способствующая увеличению индекса сопряжения и повышению эффективности собственно реакции N-деметилирования эритромицина.

Выводы

Нековалентный комплекс цитохрома P450 3A4 и рибофлавина проявляет боль-

шую каталитическую активность по сравнению с цитохромом P450 3A4.

Соотношение цитохром P450 3A4 : рибофлавин 1:10 является более эффективным по сравнению с соотношением 1:1.

Комплексы цитохром P450 3A4 : рибофлавин моделируют цитохром P450-зависимую микросомальную монооксигеназную систему, которая позволяет повысить эффективность электрокатализа.

В дальнейшем будет исследована каталитическая активность комплексов цитохрома P450 и рибофлавина по отношению к широкому спектру субстратов и реакциям, характерным для цитохрома P450, а также роль рибофлавина в генерации активных форм кислорода в электрохимических системах с участием цитохромов P450.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Кузиков А.В., Булко Т.В., Королева П.И., Масамрех Р.А., Бабкина С.С., Гилеп А.А., Шумянцева В.В. Цитохром P450 3A4 как фермент биотрансформации лекарств: роль модификаций сенсорных систем в электрокатализе и электроанализе. *Биомедицинская химия*. 2020;66(1):64–70. [Kuzikov A.V., Bulko T.V., Koroleva P.I., Masamrekh R.A., Babkina S.S., Gilep A.A., Shumyantseva V.V. Tsitokhrom P450 3A4 kak ferment biotransformatsii lekarstv: rol' modifikatsiy sensorykh sistem v elektrokatalize i elektroanalize [Electroanalytical and electrocatalytic characteristics of cytochrome P450 3A4 using electrodes modified with nanocomposite carbon nanomaterials]. *Biomeditsinskaya khimiya [Biomedical chemistry]*. 2020;66(1):64–70. (In Russian)]. DOI: 10.18097/PBMC20206601064.
2. Bhatt M.R., Khatri Y., Rodgers R.J., Martin L.L. Role of cytochrome b5 in the modulation of the enzymatic activities of cytochrome P450 17 α -hydroxylase/17,20-lyase (P450 17A1). *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2016;170:2–18. DOI: 10.1016/J.JSBMB.2016.02.033.
3. Ducharme J., Auclair K. Use of bioconjugation with cytochrome P450 enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — Proteins and Proteomics*. 2018;1866(1):32–51. DOI: 10.1016/J.BBAPAP.2017.06.007.
4. Nash T. The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. *Biochem. J.* 1953;55:416–421. DOI: 10.1042/bj0550416.
5. Panico P., Castrignanò S., Sadeghi S.J., Di Nardo G., Gilardi G. Engineered human CYP2C9 and its main polymorphic variants for bioelectrochemical measurements of catalytic response. *Bioelectrochemistry* 2021;138:107729. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2020.107729.
6. Pechurskaya T.A., Lukashevich O.P., Gilep A.A., Usanov S.A. Engineering, expression, and purification of “soluble” human cytochrome P45017 α and its functional characterization. *Biochemistry (Moscow)*. 2008;73(7):806–811. DOI: 10.1134/S0006297908070092.
7. Shumyantseva V.V., Uvarov V.Y., Byakova O.E., Archakov A.I., Semisynthetic flavocytochromes based on cytochrome P450 2B4: Reductase and oxygenase activities. *Arch. Biochem. Biophys.* 1998;377(1):133–138. DOI: 10.1006/abbi.1998.0628.
8. Zhang C., Lu M., Lin L., Huang Z., Zhang R., Wu X., Chen Y. Riboflavin is directly involved in the N-dealkylation catalyzed by bacterial cytochrome P450 monooxygenases. *ChemBioChem*. 2020;21:2297–2305. DOI: 10.1002/cbic.202000071.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Королёва Полина Игоревна*, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича»;
e-mail: 11126699@mail.ru

Polina I. Koroleva*, Research Institute of Biomedical Chemistry named after V.N. Orekhovich;
e-mail: 11126699@mail.ru

Шумянцева Виктория Васильевна, д.б.н., проф., ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича»;
e-mail: viktoria.shumyantseva@ibmc.msk.ru

Victoria V. Shumyantseva, Dr. Sci. (Biol.), Prof., Research Institute of Biomedical Chemistry named after V.N. Orekhovich;
e-mail: viktoria.shumyantseva@ibmc.msk.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author



УЛЬТРАЗВУКОВАЯ ОЦЕНКА РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ТРИКАЛЬЦИЙФОСФАТНОГО НАПОЛНИТЕЛЯ ПО ОБЪЕМУ НАБУХШИХ ПОРИСТЫХ МАТРИКСОВ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА ДЛЯ БИОМЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

О.Р. Куликова^{1*}, Е.А. Храмцова¹, К.Г. Антипова², Т.Д. Пацаев², Е.С. Мороков¹,
К.И. Луканина², В.М. Левин¹, Т.Е. Григорьев²

¹ ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН
119334, Российская Федерация, Москва, ул. Косыгина, 4

² Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»
123182, Российская Федерация, Москва, пл. Академика Курчатова, 1

Регенеративная медицина — быстро развивающаяся междисциплинарная область. Основным интересом представляют новые материалы и механизмы их взаимодействия с живым организмом. Методы исследования изучаемых объектов должны обеспечивать как объёмную визуализацию, так и предоставлять оценку количественных характеристик неинвазивно. Перспективными для этих целей являются методы, основанные на применении ультразвука и отображающие вариации упругих свойств образцов.

Ключевые слова: пористый матрикс, хитозан, композит, акустическая микроскопия

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности: пористые матриксы на основе хитозана разработаны в рамках ВНИР НИЦ «Курчатовский институт», ультразвуковые исследования проведены при поддержке гранта РФФИ № 20-33-70095.

Для цитирования: Куликова О.Р., Храмцова Е.А., Антипова К.Г., Пацаев Т.Д., Мороков Е.С., Луканина К.И., Левин В.М., Григорьев Т.Е. Ультразвуковая оценка распределения трикальцийфосфатного наполнителя по объёму набухших пористых матриксов на основе хитозана для биомедицинского применения. *Биомедицина*. 2021;17(3E):42–47. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-42-47>

Поступила 16.04.2021

Принята после доработки 13.05.2021

Опубликована 20.10.2021

ULTRASONIC ASSESSMENT OF THE DISTRIBUTION OF TRICALCIUM PHOSPHATE FILLER OVER THE VOLUME OF SWOLLEN POROUS MATRICES BASED ON CHITOSAN FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS

Olga R. Kulikova^{1*}, Elena A. Khramtsova¹, Kristina G. Antipova², Timofey D. Patsaev²,
Egor S. Morokov¹, Ksenia I. Lukanina², Vadim M. Levin¹, Timofey E. Grigoriev²

¹ Emanuel Institute of Biochemical Physics of the Russian Academy of Sciences
119334, Russian Federation, Moscow, Kosyгина Str., 4

² National Research Center “Kurchatov Institute”
123098, Russian Federation, Moscow, Akademika Kurchatova Square, 1

Regenerative medicine is a rapidly developing interdisciplinary field of science. Of primary interest are new materials and mechanisms of their interaction with living organisms. Investigation methods should

provide 3D visualization and analysis of quantitative characteristics, while having no effect on the objects under study. For these purposes, methods based on ultrasound and those displaying variations in the elastic properties of samples are promising.

Keywords: porous matrix, chitosan, composite, acoustic microscopy

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements: porous matrices based on chitosan were developed by NRC «Kurchatov Institute». Ultrasound studies were carried out with the support of the RFBR Grant No. 20-33-70095.

For citation: Kulikova O.R., Khrantsova E.A., Antipova K.G., Patsaev T.D., Morokov E.S., Lukanina K.I., Levin V.M., Grigoriev T.E. Ultrasonic Assessment of the Distribution of Tricalcium Phosphate Filler over the Volume of Swollen Porous Matrices Based on Chitosan for Biomedical Applications. *Journal Biomed.* 2021;17(3E):42–47. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-42-47>

Submitted 16.04.2021

Revised 13.05.2021

Published 20.10.2021

Введение

В регенеративной медицине проведённые в мировой практике экспериментальные ультразвуковые исследования показали свою эффективность [4, 6, 7]. Биосинтетические матрицы при одинаковом составе биополимеров могут быть сформованы различными методами, что позволяет применять их для замещения целого ряда дефектов тканей. Перспективными являются матрицы, имеющие структуру гидрогелей, что связано не только с их доступностью и разнообразием, но и возможностью создания раневых покрытий [3], применения в ортопедии для замены и восстановления утраченной части хряща, костной ткани [1], а также использования как несущей конструкции активных матриц, содержащих клетки, факторы роста, лекарственные препараты. Гидрогелевые матрицы, их структура и упруго-механические свойства были исследованы ультразвуковыми методами [2, 5, 8].

Гидрогелевые матрицы на основе хитозана, кроме биосовместимости и биорезорбируемости, обладают остеокондуктивными свойствами, т. е. выполняют роль пассивного матрикса при формировании костной ткани, композиты на его основе активно применяются для создания костных имплантов [9]. При этом особый интерес в этой области представляют матрицы,

имеющие открытые поры, которые обеспечивают проникновение клеток в объём имплантата и неоваскуляризацию. Улучшить свойства матрикса можно за счёт добавления остеоиндуктивных факторов роста, например BMP-2, которые будут стимулировать биоминерализацию имплантата [10].

В данной работе был смоделирован процесс биоминерализации пористого матрикса на основе хитозана, за счёт разной степени наполнения минеральными компонентами, для определения возможностей метода акустической микроскопии в визуализации структуры и оценке состава такого типа матриц.

Материалы и методы

Изготовление матриц. Предварительно получен 2% р-р хитозана (Primex ChitoClear HQG 43040 — 600 кДа) в 2% уксусной кислоте (УК, особо чистая, ООО «Компонент-Реактив», Россия). Объёмная доля наполнителя — трикальцийфосфат (ТКФ, «Sigma Aldrich», США) — варьировалась в пределах от 1 до 25 об.%. Для улучшения механических свойств образцы шивали 2,5% глутаровым альдегидом (ГА) в 2% УК (из расчёта 1% от веса полимера). Пористость получаемого материала поддерживали на уровне 98,8%. Для получения композитов компоненты смешивали с частицами ТКФ (диаметр частиц — 70 нм, высота — 200 нм) в пропорциях из таблицы.

Таблица. Концентрации компонент для получения композитов
Table. Concentrations of components for obtaining composites

Объёмная доля ТКФ, %	Массовая доля ТКФ, %	ТКФ, г	2% хитозан, г	2,5% ГА, г	H ₂ O, г
0	0	0	7,80	0,06240	2,17360
5	12,71	0,01884	7,41	0,05928	2,55892
10	26,84	0,03768	7,02	0,05616	2,94424
25	80,51	0,0942	5,85	0,04680	4,10020

Растворы гомогенизировали на магнитной мешалке в течение 6 ч. Для более равномерного диспергирования частиц ТКФ полимерный раствор помещали в ультразвуковую ванну на 30 мин. Гомогенизированные растворы замораживали на установке, обеспечивающей температурный градиент, для формирования направленных пор в материале. Замороженные образцы лиофилизировали в течение 48 ч на установке Martin Christ Alpha 2-4LSC в режиме «main-drying» с глубиной вакуума 0,250 мбар. За 2 ч до извлечения образцов использовали режим «final drying» с глубиной вакуума 0,010 мбар. Таким образом, были получены высокопористые композиты с ориентированными порами.

Морфологию образцов изучали методом сканирующей электронной микроскопии с помощью системы Versa 3D DualBeam («FEI», США) в режиме высокого вакуума. Изображения получали во вторичном электронном режиме с ультранизким ускоряющим напряжением 1 кВ. Образцы ориентировали вдоль направления пор.

В работе использовался сканирующий импульсный акустический микроскоп SIAM-2010, разработанный в Институте биохимической физики РАН, оснащённый линзой 50 МГц, 30°, фокусное расстояние — 4 мм, обеспечивающей латеральное разрешение порядка 36 мкм. Режим получения изображений: С-скан — реконструкция изображения плоскости образца, перпендикулярной оси линзы, и расположенной в зоне фокуса при сканировании; В/D-скан — реконструкция изображения, соответствующая поперечному сечению через образец по направлению оси линзы и полученная при использовании динамической фокусировки во время сканирования.

Статистический анализ проводился с помощью t-критерия Стьюдента. Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследований

Полученные микрофотографии показывают ячеистую структуру и наличие ориентации пор у образцов. Средний размер пор — 30 мкм. На рис. 1 видны включения частиц ТКФ в стенку губчатого материала.

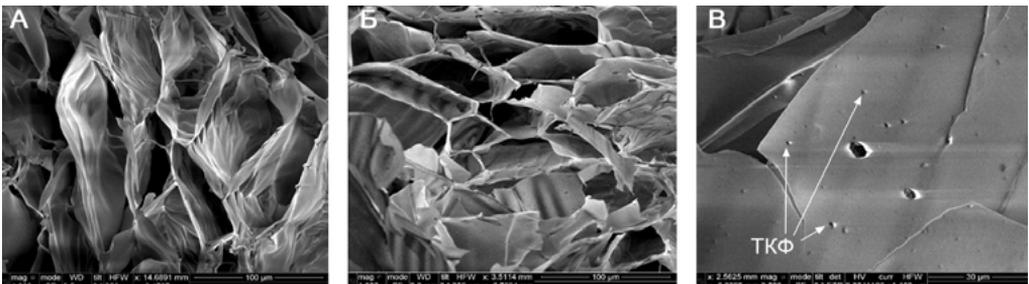


Рис. 1. Микрофотографии образцов губчатых матриц: А — объёмная доля ТКФ 0%, разрешение 100 мкм; Б — объёмная доля 20%, разрешение 100 мкм; В — объёмная доля 20%, разрешение 30 мкм.

Fig. 1. Micrographs of porous matrices: А — volume fraction of TCP 0%, resolution 100 μm; Б — volume fraction 20%, resolution 100 μm; В — volume fraction 20%, resolution 30 μm.

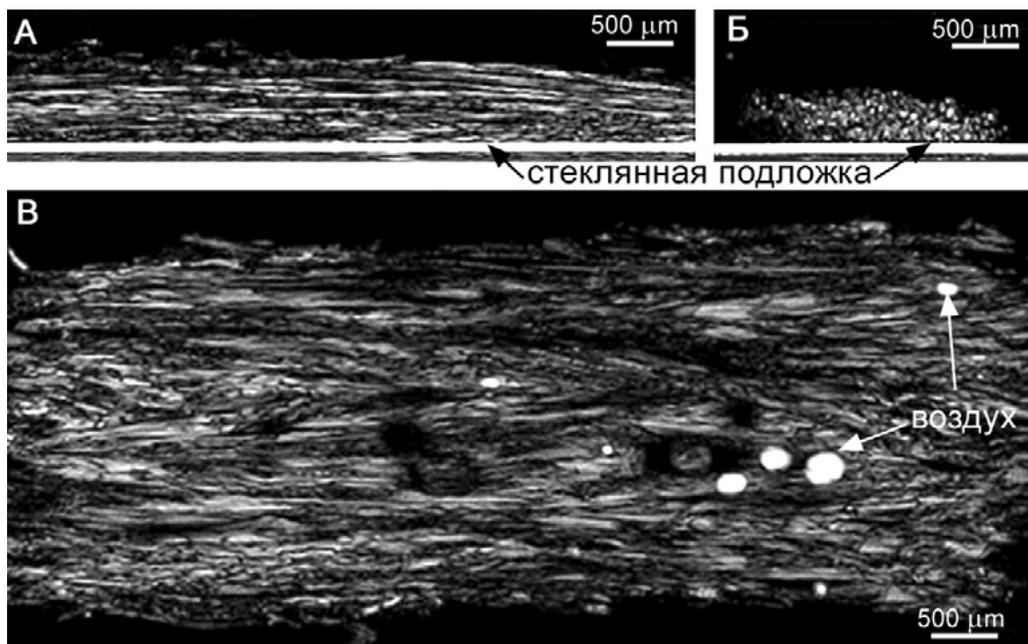


Рис. 2. Акустические изображения набухшего матрикса, частота 50 МГц. А — В/D-скан, продольное сечение пор; Б — В/D-скан, поперечное сечение пор; В — С-скан в объёме образца.

Fig. 2. Acoustic images of swollen matrices, frequency 50 MHz. А — В/D-scan along pores; Б — В/D-scan cross-section of pores; В — C-scan of the sample volume.

Полученные образцы исследовали с помощью акустической микроскопии после набухания в иммерсионной жидкости (дистиллированной воде). Образец располагался на стеклянной подложке для последующего измерения затухания.

Ультразвуковые изображения (рис. 2) отображают внутреннюю структуру матрикса: поры матрикса протяжённые, интеркалированные, открытые, ориентированы в одном направлении, заполнены иммерсией. На тех же образцах были проведены измерения коэффициента затухания.

Выводы

Разрешение метода является недостаточным для визуализации включений частиц ТКФ, однако не менее информативным является анализ объёмных характеристик. Была проведена ультразвуковая оценка распределения наполнителя по объёму образца

матрикса. Выявлена закономерность затухания ультразвукового сигнала в зависимости от концентрации наполнителя в композитном матриксе.

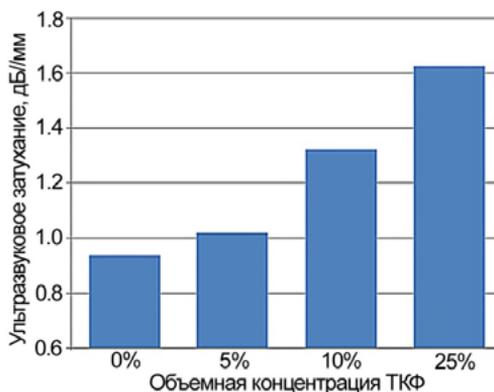


Рис. 3. Зависимость коэффициента затухания, нормированная по толщине образцов, в зависимости от количества наполнителя.

Fig. 3. The attenuation coefficient, normalized by the sample thickness, depending on the amount of filler.

Ультразвуковая микроскопия показала высокую эффективность для неинвазивной визуализации микроструктуры и количественного определения концентрации ТКФ в полученных пористых матриксах.

Данный метод может быть рекомендован как перспективный для исследования процессов биоминерализации матриц в присутствии клеточных компонентов и остеоиндуктивных факторов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Grigoriev T.E., Zagoskin Y.D., Belousov S.I., et al. Influence of molecular characteristics of chitosan on properties of *in situ* formed scaffolds. *BioNanoSci.* 2017;7:492–495. DOI: 10.1007/S12668-017-0411-5.
2. Gudur M., Rao R.R., Hsiao Y.S., Peterson A.W., Deng C.X., Stegemann J.P. Noninvasive, quantitative, spatiotemporal characterization of mineralization in three-dimensional collagen hydrogels using high-resolution spectral ultrasound imaging. *Tissue engineering.* 2012;18(12):935–946. DOI: 10.1089/ten.TEC.2012.0180.
3. Gumenyuk A., Ushmarov D., Gumenyuk S., Gayvoronskaya T., Sotnichenko A., Melkonyan K., Manuylov A., Antipova K., Lukanina K., Grigoriev T., Domenyuk D. Potential use of chitozan-based multilayer wound covering in dental practice. *Archiv Euromedica.* 2019;9(3):76–80.
4. Khrantsova E., Morokov E., Lukanina K., Grigoriev T., Petronyuk Y., Shepelev A., Gubareva E., Kuevda E., Levin V., Chvalun S. Impulse acoustic microscopy: A new approach for investigation of polymer and natural scaffolds: Impulse Acoustic Microscopy. *Polymer Engineering and Science.* 2017;57(7):709–715. DOI: 10.1002/pen.24617.
5. Mansour J.M., Gu D.W., Chung C.Y., Heebner J., Althans J., Abdalian S., Schluchter M.D., Liu Y., Welter J.F. Towards the feasibility of using ultrasound to determine mechanical properties of tissues in a bioreactor. *Annals of biomedical engineering.* 2014;42(10):2190–2202. DOI: 10.1007/s10439-014-1079-4.
6. Morokov E., Khrantsova E., Kuevda E., Gubareva E., Grigoriev T., Lukanina K., Levin V. Noninvasive ultrasound imaging for assessment of intact microstructure of extracellular matrix in tissue engineering. *Artificial Organs.* 2019;43(11):1104–1110. DOI: 10.1111/aor.13516.
7. Morokov E.S., Demina V.A., Sedush N.G., Kalinin K.T., Khrantsova E.A., Dmitryakov P.V., Bakirov A.V., Grigoriev T.E., Levin V.M., Chvalun S.N. Noninvasive high-frequency acoustic microscopy for 3D visualization of microstructure and estimation of elastic properties during hydrolytic degradation of lactide and ϵ -caprolactone polymers. *Acta Biomaterialia.* 2020;109:61–72. DOI: 10.1016/j.actbio.2020.04.011.
8. Ruland A., Chen X., Khansari A., Fay C.D., Gambhir S., Yue Z., Wallace G.G. A contactless approach for monitoring the mechanical properties of swollen hydrogels. *Soft matter.* 2018;14(35):7228–7236. DOI: 10.1039/c8sm01227j.
9. Vasilyev A.V., Kuznetsova V.S., Bukharova T.B., Grigoriev T.E., Zagoskin Y., Korolenkova M.V., Zorina O.A., Chvalun S.N., Goldstein D.V., Kulakov A.A. Development prospects of curable osteoplastic materials in dentistry and maxillofacial surgery. *Heliyon.* 2020;6(8):e04686. DOI: 10.1016/j.heliyon.2020.e04686.
10. Vasilyev A.V., Kuznetsova V.S., Bukharova T.B., Grigoriev T.E., Zagoskin Y.D., Nedorubova I.A., Babichenko I.I., Chvalun S.N., Goldstein D.V., Kulakov A.A. Influence of the degree of deacetylation of chitosan and BMP-2 concentration on biocompatibility and osteogenic properties of BMP-2/PLA granule-loaded chitosan/ β -glycerophosphate hydrogels. *Molecules (Basel, Switzerland).* 2021;26(2):261. DOI: 10.3390/molecules26020261.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Куликова Ольга Режаббаевна*, ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН;
e-mail: olga.kulikova.2012@list.ru

Храмцова Елена Александровна, к.б.н., ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН;
e-mail: alyonushk@gmail.com

Olga R. Kulikova*, Emanuel Institute of Biochemical Physics of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: olga.kulikova.2012@list.ru

Elena A. Khrantsova, Cand. Sci. (Biol.), Emanuel Institute of Biochemical Physics of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: alyonushk@gmail.com

Антипова Кристина Георгиевна, Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»;
e-mail: kris444ti@yandex.ru

Kristina G. Antipova, National Research Center “Kurchatov Institute”;
e-mail: kris444ti@yandex.ru

Пацаев Тимофей Дмитриевич, Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»;

Timofey D. Patsaev, National Research Center “Kurchatov Institute”

Мороков Егор Степанович, к.ф.-м.н., ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН;
e-mail: es_morokov@yahoo.com

Egor S. Morokov, Cand. Sci. (Phys.-Math.), Emanuel Institute of Biochemical Physics of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: es_morokov@yahoo.com

Луканина Ксения Игоревна, к.т.н., Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»;
e-mail: lukanina_ki@nrcki.ru

Ksenia I. Lukanina, Cand. Sci. (Tech.), National Research Center “Kurchatov Institute”;
e-mail: lukanina_ki@nrcki.ru

Левин Вадим Моисеевич, к.ф.-м.н., ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН;
e-mail: levin1943@gmail.com

Vadim M. Levin, Cand. Sci. (Phys.-Math.), Emanuel Institute of Biochemical Physics of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: levin1943@gmail.com

Григорьев Тимофей Евгеньевич, к.ф.-м.н., Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»;
e-mail: grigoriev@nrcki.ru

Timofey E. Grigoriev, Cand. Sci. (Phys.-Math.), National Research Center “Kurchatov Institute”;
e-mail: grigoriev@nrcki.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

<https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-48-52>



ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ЛИНИЙ МЫШЕЙ ПО ГЕНУ *TPH2* В РУТИННОЙ ПРАКТИКЕ: ВЫБОР МЕТОДИКИ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПЦР

К.А. Курбаков, А.А. Кибиткина*, Л.В. Федулова, Е.Р. Василевская, Г.С. Толмачева

ФГБНУ «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН
109316, Российская Федерация, Москва, ул. Талалихина, 26

Для использования биомоделей с нокаутом гена *TPH2* в экспериментах ключевым моментом является разработка быстрого и высокоточного протокола генотипирования. В настоящее время генотипирование мутантных мышей проводится с помощью методов, включающих секвенирование или многоступенчатую ПЦР, являющиеся дорогостоящими и занимающими продолжительное время. В работе приведён сравнительный анализ двух методов: с помощью детекции продуктов амплификации гелем-электрофорезом и ПЦР в реальном времени. Также рассмотрена процедура выделения ДНК из фрагментов хвостов мышей.

Ключевые слова: ПЦР, выделение ДНК, ген *TPH2*

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Курбаков К.А., Кибиткина А.А., Федулова Л.В., Василевская Е.Р., Толмачева Г.С. Генотипирование линий мышей по гену *TPH2* в рутинной практике: выбор методики выделения ДНК для проведения ПЦР. *Биомедицина*. 2021;17(3E):48–52. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-48-52>

Поступила 15.04.2021

Принята после доработки 11.05.2021

Опубликована 20.10.2021

GENOTYPING OF MICE LINES FOR THE *TPH2* GENE IN ROUTINE PRACTICE: SELECTION OF A DNA EXTRACTION TECHNIQUE FOR PCR

Konstantin A. Kurbakov, Anastasiya A. Kibitkina*, Liliya V. Fedilova,
Ekaterina R. Vasilevskaya, Galina S. Tolmacheva

V.M. Gorbakov Federal Research Center for Food Systems of the Russian Academy of Sciences
109316, Russian Federation, Moscow, Talalikhina Str., 26

The development of a fast and highly accurate genotyping protocol is crucial for the use of biomodels with *TPH2* gene knockout in experiments. Genotyping of mutant mice is currently carried out using methods that include sequencing or multi-stage PCR. These methods are expensive and time-consuming. This paper presents a comparative analysis of two methods: detection of amplification products by gel electrophoresis and real-time PCR. The procedure for extracting DNA from fragments of mice tails is also considered.

Keywords: PCR, DNA extraction, gene *TPH2*

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Kurbakov K.A., Kibitkina A.A., Fedilova L.V., Vasilevskaya E.R., Tolmacheva G.S. Genotyping of Mice Lines for the *TPH2* Gene in Routine Practice: Selection of a DNA Extraction Technique for PCR. *Journal Biomed*. 2021;17(3E):48–52. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-48-52>

Submitted 15.04.2021

Revised 11.05.2021

Published 20.10.2021

Введение

Снижение экспрессии и функции триптофангидроксилазы 2 (*TRH2*), являющейся ферментом, лимитирующим скорость выработки серотонина мозга из триптофана, связаны с тревожностью, депрессией и агрессией у различных видов, включая человека и грызунов [8]. В связи с чем мутантные мыши с нокаутом гена *TRH2* являются высокоточной биомоделью [2, 4]. Отбор тканей производится, как правило, биопсией хвоста. Так как хрящевая, костная ткань и эпителий являются сложными для выделения ДНК объектами [10], предлагаются различные варианты модификаций методик [7, 9]. В качестве альтернативы предложено предварительное замораживание биопсий в жидком азоте [9]. Идентификация, как правило, осуществляется ПЦР с детекцией методом гель-электрофореза. Gutknecht с соавт. [5] использовали систему трёх праймеров для идентификации «дикого» и мутантного аллелей гена *TRH2*, результатом ПЦР являлись ампликоны длиной 437 и 387 азотистых оснований.

Целью настоящей работы являлось сравнение методов генотипирования и выделения ДНК мутантных мышей по гену *TRH2*.

Материалы и методы

Мутантные мыши с нокаутом *TRH2* получены от поголовья гетерозиготных мышей C57BL/6J *TRH2*hCMVcre SPF-категории племенной колонии Бицентра ZEMM (Вюрцбург, Германия) [4]. Отбор фрагментов хвоста (по два образца 2–3 мм) от особей дикого типа (WT: 1–3), гетерозиготных нокаутных *TRH2* (HET: 4–6), гомозиготных нокаутных *TRH2* (KO: 7–9) производили с использованием Новокаина («Нижфарм», Россия), обработкой раневой поверхности Капрамином («ВладМива», Россия). Один образец подвергали длительному лизису (18 ч); второй — замораживанию в жидком азоте. Выделение ДНК проводили на-

бором Сорб-ГМО-Б согласно инструкции («Синтол», Россия). Для проведения ПЦР использовали праймеры: *TRH2* F KO 5' CACCCACCTTGCAGAAATGTTTA 3', ампликон длиной 387; *TRH2* F WT 5' TGGGGCATCTCAGGACGTAAGT 3', ампликон длиной 437 и *TRH2* R 5' TGGGGCCTGCCGATAGTAACAC 3' [5]. ПЦР в реальном времени проводили на амплификаторе АНК-32 («Синтол», Россия). Реакционная смесь (25 мкл) содержала праймеры (300 нМ), 2,5× реакционной смеси с красителем EVAgreen («Синтол», Россия) (10 мкл), изолированную ДНК (2 мкл). Режим ПЦР реакции: денатурация (95°C/5 мин); 40 циклов амплификации (95°C/15 сек; 64°C/30 сек и 72°C/10 сек). По полученным циклам отсечения (*Ct*) в ПЦР с системой трёх праймеров сравнивали выход ДНК, полученный с длительным лизисом (*Ct*_{лиз}) и с замораживанием в жидком азоте (*Ct*_{азот}). Для идентификации проводили отдельные реакции: для обнаружения аллеля «дикого типа» — с парой праймеров *TRH2* F WT и *TRH2* R, для обнаружения мутантного аллеля — с *TRH2* F KO и *TRH2* R. Анализ ПЦР в реальном времени проводили в трёхкратной повторности. В качестве отрицательных контролей использовали реакционные смеси без внесённой ДНК. Среднеарифметический результат трёх повторностей и их стандартного отклонения ($M \pm m$) рассчитывали с использованием Microsoft Excel (2016). Ампликоны, полученные в ПЦР с использованием трёх праймеров, разделяли электрофорезом в TBE буфере в 3% агарозном геле («Thermo Scientific», Испания), окрашивали SIBRgreen I («Силекс», Россия), использовали маркер длин 100–1500 азотистых оснований.

Результаты и их обсуждение

Результаты ПЦР в реальном времени приведены в таблице. В пробирках отрицательных контролей амплификации не наблю-

Таблица. Результаты ПЦР в реальном времени ($M \pm m$)
Table. Results of real-time PCR ($M \pm m$)

№	Продолжительный лизис		Замораживание в жидком азоте				
	Масса навески, мг	$Ct_{\text{лиз}}$	Масса навески, мг	$Ct_{\text{азот}}$	$Ct'(WT)$	$Ct'(KO)$	$\Delta Ct''$
1	5,1	32,67±0,56	4,6	20,40±0,05	19,90±0,10		12,27
2	4,9	29,60±0,04	4,9	20,46±0,03	20,27±0,06		9,14
3	3,6	24,95±0,11	3,6	19,73±0,16	19,67±0,21		5,22
4	2,6	29,98±0,38	2,1	19,62±0,11	20,79±0,17	20,74±0,20	10,36
5	3,7	29,82±0,42	3,5	20,03±0,09	20,66±0,03	20,67±0,08	9,79
6	3,5	31,74±0,39	3,5	20,11±0,12	20,86±0,15	20,71±0,25	11,62
7	5,6	29,53±0,23	5,5	20,17±0,08		19,91±0,07	9,36
8	4,2	29,89±0,4	4,7	20,11±0,19		20,77±0,02	9,78
9	4,8	26,87±0,17	4,6	20,37±0,11		20,56±0,07	6,49

Примечание: * Ct — цикл отсечения; ** — разница значений Ct между образцами, выделенными с длительным лизисом и с замораживанием.

Note: * Ct — cut-off cycle; ** — difference in Ct values between samples isolated during prolonged lysis and freezing.

далось, не было неспецифической реакции образцов 1–3 (WT) с праймерами для обнаружения КО и наоборот.

Установлен лучший выход ДНК для образцов с замораживанием в жидком азоте — цикл отсечения был меньше, чем у образцов, выделенных длительным лизисом (табл.). Наименьшая разница Ct 5,22 соответствовала отношению 0,03 между полученными концентрациями ДНК. При этом наибольшее расхождение массы навески (образец 4) не превышало отношение 0,8, следовательно, масса навесок не вносила значительный вклад в полученные результаты. Ранее были получены близкие значения Ct при выделении ДНК с использованием продолжительного лизиса — Ct образцов, предварительно за-

мороженных в жидком азоте, показывали сходный выход геномной ДНК по сравнению с длительным лизисом [1, 6]. При исследовании гетерозиготных линий мышей нами получены близкие значения Ct , т. к. аллели в образцах соотносятся как 1:1. Идентификация методом ПЦР в реальном времени в двух реакциях позволяла различать между собой WT, КО и HET.

Гель-электрофорез продуктов ПЦР с использованием системы трёх праймеров (рис.) позволил выявить характерные целевые яркие полосы, при этом неспецифических продуктов амплификации не наблюдалось. Для образцов 4–6 (HET) выявлялись две полосы, достаточно близко расположенные друг к другу, свидетельствующие о наличии обеих аллелей. Как видно из ри-

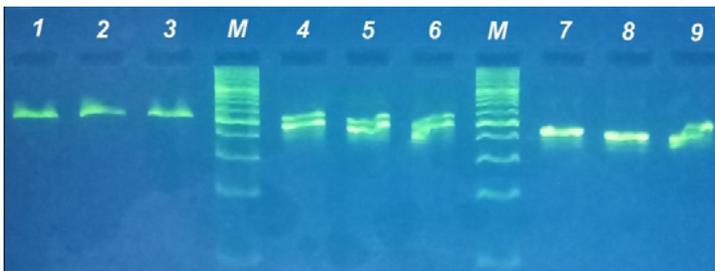


Рис. Разделение продуктов амплификации биопсий мышей гель-электрофорезом. **Условные обозначения:** 1–3 — WT; 2–6 — HET; 7–9 — КО; M — маркер.

Fig. Separation of the products of amplification of mouse biopsies by gel electrophoresis. **Symbols:** 1–3 — WT; 4–6 — HET; 7–9 — KO; M — marker.

сунка, визуальная оценка геле-электрофореграмм в рутинной практике затруднена и не позволяет отличить «дикий тип» (WT) от образца мутантного аллеля (KO).

Заключение

Предварительное замораживание биопсий в жидком азоте даёт больший и более

стабильный выход ДНК, чем длительный лизис. При визуальной оценке геле-электрофореграммы затруднительно отличить «дикий тип» от образца мутантного аллеля. Использование ПЦР в реальном времени в двух реакциях позволяет различить между собой WT, KO и НЕТ гена *TRH2* и занимает меньше времени.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Петрова Е.С. Поддержание генетически модифицированных линий мышей: вклад в развитие биокolleкций в России. *Лабораторные животные для научных исследований*. 2018;2:2–15. [Petrova E.S. Podderzhanie geneticheskii modifitsirovannykh liniy myshey: vklad v razvitie biokollektsiy v Rossii [Maintenance of genetically modified mouse strains: contribution to the development of biocollections in Russia *Laboratornye zhivotnye dlya nauchnykh issledovaniy [Laboratory animals for scientific research]*. 2018;2:2–15. (In Russian)]. DOI: 10.29926/2618723X-2018-02-01.
2. Auth C.S., Weidner M.T., Strelakova T. Differential anxiety-related behaviours and brain activation in Tph2-deficient female mice exposed to adverse early environment. *European Neuropsychopharmacology*. 2018;12:19–30. DOI: 10.1016/j.euroneuro.2018.07.103.
3. *DNeasy® Blood & Tissue Handbook*. QIAGEN, Hilden, Germany. 2006;1–62.
4. Gutknecht L., Araragi N., Merker S., Waider J., Sommerlandt F.M., Mlinar B., Baccini G., Mayer U., Proft F., Hamon M., Schmitt A.G., Corradetti R., Lanfumey L., Lesch K.P. Impacts of brain serotonin deficiency following Tph2 inactivation on development and raphe neuron serotonergic specification. *PLoS One*. 2012;7(8):e43157. DOI: 10.1371/journal.pone.0043157.
5. Gutknecht L., et al. Deficiency of brain 5-HT synthesis but serotonergic neuron formation in Tph2 knockout mice. *J. Neural Transm. (Vienna)*. 2008;115(8):1127–1132. DOI: 10.1007/s00702-008-0096-6.
6. Minaev M.Y., Solodovnikova G.I., Kurbakov K.A. Selection of DNA matrix for justification of threshold for contamination of proceed meet products with undeclared poultry components. *Theory and practice of meat processing*. 2017;2(1):27–36. DOI: 10.21323/2414-438X-2017-2-1-27-36.
7. Otaño-Rivera V., Boakye A., Grobe N., Almutairi M.M., Kursan S., Mattis L.K., Castrop H., Gurley S.B., Elased K.M., Boivin G.P., Di Fulvio M. A highly efficient strategy to determine genotypes of genetically-engineered mice using genomic DNA purified from hair roots. *Lab. Anim*. 2017;51(2):138–146. DOI: 1177/0023677216646088.
8. Pratelli M., Pasqualetti M. Serotonergic neurotransmission manipulation for the understanding of brain development and function: Learning from Tph2 genetic models. *Biochimie*. 2018;45:234–342. DOI: 10.1016/j.biochi.2018.11.016.
9. Wang Z., Storm D.R. Extraction of DNA from mouse tails. *Biotechniques*. 2006;41(4):410–412. DOI: 10.2144/000112255.
10. Wheeler A., et al. Comparison of DNA yield and STR success rates from different tissues in embalmed bodies. *Int. J. of Legal Medicine*. 2017;131(1):61–66. DOI: 10.1007/s00414-016-1405-5.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Курбаков Константин Андреевич, ФГБНУ «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН;
e-mail: homo_ludens@vniimp.ru

Кибиткина Анастасия Анатольевна*, ФГБНУ «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН;
e-mail: ankib@list.ru

Konstantin A. Kurbakov, V.M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: homo_ludens@vniimp.ru

Anastasiya A. Kibitkina*, V.M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: ankib@list.ru

Федулова Лилия Вячеславовна, к.т.н., ФГБНУ
«Федеральный научный центр пищевых систем
им. В.М. Горбатова» РАН;
e-mail: fedulova@vniimp.ru

Василевская Екатерина Романовна, к.т.н.,
ФГБНУ «Федеральный научный центр пищевых
систем им. В.М. Горбатова» РАН;
e-mail: e.vasilevskaya@fncps.ru

Толмачева Галина Сергеевна, ФГБНУ
«Федеральный научный центр пищевых систем
им. В.М. Горбатова» РАН;
e-mail: tgs2991@yandex.ru

Liliya V. Fedilova, Cand. Sci. (Tech.),
V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food
Systems of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: fedulova@vniimp.ru

Ekaterina R. Vasilevskaya, Cand. Sci. (Tech.),
V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food
Systems of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: e.vasilevskaya@fncps.ru

Galina S. Tolmacheva, V.M. Gorbatov Federal
Research Center for Food Systems of the Russian
Academy of Sciences;
e-mail: tgs2991@yandex.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

<https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-53-58>



КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ЭМБРИОНОВ МЫШЕЙ НА РАЗЛИЧНЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ ДО СТАДИИ ДВУХ БЛАСТОМЕРОВ ПОСЛЕ МИКРОИНЪЕКЦИИ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИЕЙ

С.В. Максименко^{*}, Е.С. Савченко, Н.С. Огнева

ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»
143442, Российская Федерация, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, 1

Преимплантационные эмбрионы мышей на сегодняшний день остаются самой популярной моделью, которая обычно используется для исследования раннего развития млекопитающих. Культивирование доимплантационных зародышей млекопитающих вне организма является необходимым звеном при проведении экспериментально-эмбриологических исследований, а также эмбриотехнологических работ по клонированию и получению трансгенных животных. Нормальный рост и дифференцировка эмбрионов млекопитающих *in vitro* во время доимплантационного периода зависят от наличия соответствующих метаболических субстратов. Вот почему так важно подобрать оптимальные условия культивирования при работе с микроинъекцированными эмбрионами, поскольку любые манипуляции снижают их жизнеспособность, что особенно важно при получении трансгенных животных.

Для определения наиболее эффективной культуральной среды нами было проведено исследование выживаемости эмбрионов мыши после микроинъекции генно-инженерной конструкции в пронуклеусы и дальнейшего культивирования на питательных средах M16 и Onestep. Было отмечено увеличение количества эмбрионов, развившихся до стадии двух бластомеров на среде Onestep, по сравнению со средой M16. Также были выявлены различия в двух контрольных группах, эмбрионы в которых не подвергались микроинъекции, но культивировались на этих же средах в тех же условиях, что и эмбрионы опытных групп. Более эффективной средой для культивирования интактных эмбрионов оказалась среда Onestep, в которой процент выживших эмбрионов был больше, чем в среде M16.

Ключевые слова: эмбрион, культуральная среда, микроинъекция в пронуклеусы зигот, трансгенез
Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Максименко С.В., Савченко Е.С., Огнева Н.С. Культивирование эмбрионов мышей на различных питательных средах до стадии двух бластомеров после микроинъекции генно-инженерной конструкцией. *Биомедицина*. 2021;17(3E):53–58. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-53-58>

Поступила 25.04.2021

Принята после доработки 28.06.2021

Опубликована 20.10.2021

CULTIVATION OF MICE EMBRYOS ON VARIOUS NUTRIENT MEDIA UP TO THE STAGE OF TWO BLASTOMERS AFTER THE MICROINJECTION OF A GENETICALLY-ENGINEERED CONSTRUCT

Sergey V. Maksimenko*, Elena S. Savchenko, Nastasya S. Ogneva

*Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia
143442, Russian Federation, Moscow Region, Krasnogorsk District, Svetlye Gory Village, 1*

The normal growth and differentiation of mammalian embryos *in vitro* during the pre-implantation period depends on the availability of appropriate metabolic substrates. Selection of optimal cultivation conditions when working with microinjected embryos is of significance, since any manipulations can reduce their viability. This is particularly important when obtaining transgenic animals. In order to determine the most effective culture medium, we studied the survival of mouse embryos after the microinjection of a genetically engineered construct into the pronuclei and further cultivation on the M16 and Onestep nutrient media. Compared to the M16 medium, an increase in the number of embryos that developed to the stage of two blastomeres on the Onestep medium was observed. Differences were also revealed in the two control groups, the embryos in which were not subjected to microinjection, but were cultured on the same media under the same conditions as the embryos of the experimental groups. We found that the Onestep medium, in which the percentage of survived embryos exceeded that in the M16 medium, is a more efficient medium for the cultivation of intact embryos.

Keywords: embryo, culture medium, microinjection into zygote pronuclei, transgenesis

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Maksimenko S.V., Savchenko E.S., Ogneva N.S. Cultivation of Mice Embryos on Various Nutrient Media up to the Stage of Two Blastomeres after the Microinjection of a Genetically-Engineered Construct. *Journal Biomed.* 2021;17(3E):53–58. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-53-58>

Submitted 25.04.2021

Revised 28.06.2021

Published 20.10.2021

Введение

Качество эмбрионов является ключевым фактором для осуществления успешного экстракорпорального оплодотворения, поскольку преимплантационные эмбрионы млекопитающих оказываются чувствительными к среде, в которой они развиваются, и эта чувствительность может привести к долгосрочным изменениям характеристик роста и фенотипа плода в послеродовом периоде, что имеет значение для клинического здоровья животных [5, 8].

Условия культивирования глубоко влияют на регуляцию эпигенетических генов у эмбрионов и могут иметь серьёзные последствия для здоровья потомства во взрослом возрасте. Качество и количество куль-

тивируемых эмбрионов, концентрация кислорода, наличие кумулюсных клеток и энергетических субстратов оказывают влияние на жизнеспособность и развитие эмбрионов [7].

Потенциал развития и жизнеспособность эмбрионов, культивируемых *in vitro*, постепенно снижается в процессе культивирования, несмотря на огромные достижения в области культуральных сред и условий культивирования. Разработка предимплантационных питательных сред для эмбрионов оказала существенное влияние на технологии вспомогательной репродукции и на исследования физиологии ранних эмбрионов. С помощью культивирования эмбрионов в условиях *in vitro* были описаны множество

аспектов эмбрионального развития млекопитающих, относящихся к морфологии, физиологии и молекулярным аспектам эмбриогенеза [3]. Помимо улучшения питательных сред, относительно мало исследований проводится по определению физических требований эмбрионов, культивируемых *in vitro*. Поэтому исследования, которые проводятся в этой области, до сих пор считаются актуальными. В настоящее время предпочтительной системой является культивирование в каплях, покрытых слоем минерального или парафинового масла на поверхности чашки Петри [4]. Для обеспечения развития преимплантационных эмбрионов *in vitro* важно использовать растворы с правильно подобранными компонентами в оптимальных концентрациях, а также наиболее приемлемый газовый состав атмосферы, в которой осуществляется данный процесс [2]. Основные направления развития методов культивирования эмбрионов млекопитающих включают в себя тщательный подбор условий *in vitro* для максимального повторения условий, окружающих эмбрион *in vivo* [3]. При создании питательных сред исследователи используют два основных подхода: «back-to-nature», когда компоненты и их концентрации стараются сделать максимально приближенными по составу к таковым репродуктивных путей, и «let embryo choose», когда их состав подбирают эмпирическим путём [9].

Целью этого исследования являлось сравнение эффективности двух коммерческих питательных сред — M16 и Onestep — при культивировании интактных эмбрионов мыши и эмбрионов после микроинъекции генно-инженерной конструкцией.

Материалы и методы

Гормональная подготовка самок-доноров

В качестве самок-доноров были использованы самки F1 мышей-гибридов C57BL/6 × CBA/lac в возрасте 3 недели и массой 18–

20 г, полученные из филиала «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России.

Мышей содержали в виварии с контролируемой температурой и освещением, на стерилизованной подстилке, со свободным доступом к пище и воде, при световом периоде 12 ч света и 12 ч темноты.

Для вызывания суперовуляции использовали метод гормональной стимуляции — самкам в первый день в 14⁰⁰ внутривентриально вводили по 7,5 Ед препарата, содержащего сыворотку жеребых кобыл (Сергон, Чехия), а через 47 ч внутривентриально вводили 7,5 Ед хорионического гонадотропина человека («Московский эндокринный завод», Россия). После введения хорионического гонадотропина подсаживали самок к плодовитым самцам-гибридам из расчёта 1:1. Результативность оплодотворения определяли по наличию копуляционной пробки на следующий день. Самок с копуляционными пробками считали оплодотворёнными.

Получение зигот

от самок-доноров эмбрионов

Самок-доноров умерщвляли путём дислокации шейных позвонков и обрабатывали 70% р-ром этилового спирта. Избыток спирта удаляли с помощью стерильной фильтровальной бумаги и стерильными инструментами производили послойное рассечение кожи и брюшной стенки для получения доступа к яичникам. С помощью стерильных ножниц и пинцета извлекали яйцеводы с ооцит-кумулюсными комплексами и помещали их в каплю манипуляционной среды M2 (“Sigma Aldrich”) объёмом 50 мкл. Далее под малым увеличением светового микроскопа стерильной инъекционной иглой вскрывали ампулярное пространство, извлекали ооцит-кумулюсные комплексы и помещали их в отдельную каплю с гиалуронидазой, активность которой составляла 50 МЕ/мл, для удаления кумулюсных масс. После очистки от кумулюс-

ных масс эмбрионы последовательно отмывали в трёх каплях с манипуляционной средой M2 и помещали в каплю под слоем лёгкого минерального масла.

Микроинъекция генно-инженерной конструкции в пронуклеусы зигот

Для микроинъекции отбирали оплодотворённые эмбрионы хорошего качества с двумя чётко просматриваемыми пронуклеусами. Эмбрионы были помещены в камеру Фон-Брюна с каплей манипуляционной среды M2, окружённой минеральным маслом (“Sigma Aldrich”), чтобы предотвратить испарение.

Микроинъекцию проводили в более крупный мужской пронуклеус зиготы иглой диаметром до 1 мкм на световом инвертированном микроскопе Nikon, оснащённом оптикой Номарского и микроманипуляторами Eppendorf InjectMan 4. Генно-инженерная конструкция содержалась в буфере TE для инъекций (10 мМ Tris-HCl, 0,1 мМ EDTA, pH 7,4), рабочая концентрация составляла 5–6 нг/мкл. Степень наполнения пронуклеуса определяли визуально.

Культивирование эмбрионов

После микроинъекции эмбрионы помещали в предварительно загазованные культуральные среды M16 (“Sigma Aldrich”) и Onestep (“Vitromed”) в каплях среды объёмом 36 мкл под лёгким минеральным ма-

слом в газовой фазе, содержащей 5% CO₂, при температуре 37°C и культивировали в течение 24 ч до стадии двух бластомеров. Культуральные среды не менялись в течение культивирования.

Результаты и их обсуждение

Для выявления эффективности культивирования все эмбрионы были разделены на четыре группы (две опытные и две контрольные). Эмбрионы первой опытной группы в количестве 159 штук были микроинъецированы генно-инженерной конструкцией и поставлены на культивирование в среде M16, а эмбрионы второй опытной группы в количестве 158 штук — в среде Onestep. Среда M16 была выбрана как наиболее часто используемая стандартная среда для культивирования эмбрионов мыши *in vitro* [6].

В контрольных группах эмбрионы культивировались в тех же средах, но микроинъекция не проводилась. Количество эмбрионов контрольной группы в среде M16 составило 165 штук, а в среде Onestep — 156 штук соответственно (табл.).

Таким образом, среда Onestep эффективнее M16 на 3,1% при культивировании микроинъецированных эмбрионов, и на 2,2% — при культивировании интактных эмбрионов. Из этого следует, что культуральная среда Onestep эффективнее, чем среда M16, и является более предпочти-

Таблица. Сравнение эффективности культуральных сред при культивировании микроинъецированных и интактных эмбрионов

Table. Comparison of the efficiency of culture media during the cultivation of microinjected and intact embryos

Экспериментальная группа	Количество эмбрионов, поставленных на культивирование	Количество проробившихся эмбрионов после культивирования	Процент проробившихся эмбрионов
Опытная № 1 (среда M16, микроинъецированные эмбрионы)	159	145	91,2
Опытная № 2 (среда Onestep, микроинъецированные эмбрионы)	158	149	94,3
Контрольная № 1 (среда M16, интактные эмбрионы)	166	159	95,8
Контрольная № 2 (среда Onestep, интактные эмбрионы)	156	153	98,0

тельной для использования при получении трансгенных мышей.

Заключение

Чтобы успешно реализовывать биотехнологические программы, а также для проведения фундаментальных исследований на эмбрионах необходимо создание оптимальных культуральных систем, обеспечивающих полноценное развитие эмбрионов вне организма.

В настоящее время существует разнообразие питательных сред для культивирования *in vitro* преимплантационных эмбрионов млекопитающих. Качественный

и количественный состав этих сред может оказывать существенное влияние на пре- и постимплантационное развитие [2].

При получении трансгенных мышей необходимо проводить тщательное тестирование различных систем культивирования эмбрионов, а также осуществлять подбор культуральных сред, чтобы максимально эффективно использовать имеющийся биологический материал [1]. Поскольку на сегодняшний день исследователям может быть предложено большое количество различных питательных сред, необходимость выявления наиболее эффективной культуральной среды остаётся одной из главных задач.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Вильянович Л.И., Кривохарченко А.С. Культивирование двухклеточных эмбрионов мышей *in vitro* в среде DMEM без белка. *Проблемы репродукции*. 1999;4:22–25. [Vilyanovich L.I., Krivokharchenko A.S. Kul'tivirovanie dvukletochnykh embrionov myshey *in vitro* v srede DMEM bez belka [In vitro cultivation of two-cell mouse embryos in DMEM medium without protein]. *Reproduction problems*. 1999;4:22–25. (In Russian)].
2. Раннева С.В., Брусенцева Е.Ю., Игонина Т.Н., Рагаева Д.С., Рожкова И.Н., Ершова Н.И., Левинсон А.Л., Амстиславский С.Я. Влияние культивирования эмбрионов на онтогенез потомства у млекопитающих. *Онтогенез*. 2020;51(6):417–439. [Ranneva S.V., Brusentseva E.Yu., Igonina T.N., Ragaeva D.S., Rozhkova I.N., Ershova N.I., Levinson A.L., Amstislavsky S.Ya. Vliyanie kul'tivirovaniya embrionov na ontogenez potomstva u mlekopitayushchikh [The influence of embryo cultivation on the ontogeny of offspring in mammals]. *Ontogenesis*. 2020;51(6):417–439. (In Russian)]. DOI: 10.31857/S0475145020060075.
3. Baltz J.M. Connections between preimplantation embryo physiology and culture. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2013;30(8):1001–1007. DOI: 10.1007/s10815-013-0095-x.
4. Dai S.-J., Xu Ch.-L., Wang J., Sun Y.-P. Effect of culture medium volume and embryo density on early mouse embryonic development: Tracking the development of the individual embryo. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2012;29(7):617–623. DOI: 10.1007/s10815-012-9744-8.
5. Fleming T.P., Wing Y.K., Porter R., Ursell E., Fesenko I., Wilkins A., Miller D.J., Watkins A.J., Eckert J.J. The embryo and its future. *Biology of Reproduction*. 2004;71(4):1046–1054. DOI: 10.1095/biolreprod.104.030957.
6. Hogan B., Costantini F., Lacy E. *Manipulating the mouse embryo: A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor, 1986:332.
7. Khurana N.K., Niemann H. Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos. *Theriogenology*. 2020;54(5):741–756. DOI: 10.1016/S0093-691X(00)00387-3.
8. Popova E., Bader M., Krivokharchenko A. Effect of culture conditions on viability of mouse and rat embryos developed *in vitro*. *Genes (Basel)*. 2011;2(2):332–344. DOI: 10.3390/genes2020332.
9. Summers M.C., Biggers J.D. Chemically defined media and the culture of mammalian preimplantation embryos: Historical perspective and current issues. *Hum. Reprod. Update*. 2003;9(6):557–582. DOI: 10.1093/humupd/dmg039.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Максименко Сергей Васильевич*, к.б.н.,
ФГБУН «Научный центр биомедицинских тех-
нологий ФМБА России»;
e-mail: vx136@rambler.ru

Sergey V. Maksimenko*, Cand. Sci. (Biol.),
Scientific Center of Biomedical Technologies
of the Federal Medical and Biological Agency
of Russia;
e-mail: vx136@rambler.ru

Савченко Елена Сергеевна, ФГБУН «Научный
центр биомедицинских технологий ФМБА
России»;
e-mail: savelaine@gmail.com

Elena S. Savchenko, Scientific Center
of Biomedical Technologies of the Federal Medical
and Biological Agency of Russia;
e-mail: savelaine@gmail.com

Огнева Настасья Сергеевна, ФГБУН
«Научный центр биомедицинских технологий
ФМБА России»;
e-mail: ognevanastya@mail.ru

Nastasya S. Ogneva, Scientific Center
of Biomedical Technologies of the Federal Medical
and Biological Agency of Russia;
e-mail: ognevanastya@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

<https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-59-63>



ОЦЕНКА ЭЛИМИНАЦИИ ЯДЕРНОГО МАТЕРИАЛА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДАХ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗАЦИИ ДЕРМЫ

К.И. Мелконян¹, Т.В. Рушинова¹, Я.А. Козмай^{1*}, А.С. Асякина^{1,2}

¹ ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России
350063, Российская Федерация, Краснодар, ул. Митрофана Седина, 4

² ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет»
350040, Российская Федерация, Краснодар, ул. Ставропольская, 149

В исследовании была проведена сравнительная оценка степени дезинтеграции и элиминации ядерного материала в образцах децеллюляризированной дермы свиньи, получаемых с помощью химического, детергентного и ферментативного методов обесклевывания и выступающих в качестве потенциальных раневых покрытий. В качестве химического метода (Протокол № 1) выступала обработка растворами NaOH и H₂O₂, при детергентном методе (Протокол № 2) использовались растворы Тритона X-100 и дезоксихолата натрия в комбинации с Na₂-ЭДТА, при ферментативном (Протокол № 3) — растворы трипсина-Версена и свиной панкреатической ДНКазы. После получения образцов в них и в образцах нативной дермы (контрольная группа) проводился анализ количества ДНК, результаты которого показали соответствие критериям эффективного обесклевывания во всех образцах. Была установлена перспективность использования детергентного метода по сравнению с другими методиками создания обесклеванных дермальных матриц.

Ключевые слова: децеллюляризация, дермальные раневые покрытия, ядерный материал, детергентная обработка, ферментативный метод, химический метод

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Мелконян К.И., Рушинова Т.В., Козмай Я.А., Асякина А.С. Оценка элиминации ядерного материала при различных методах децеллюляризации дермы. *Биомедицина*. 2021;17(3E):59–63. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-59-63>

Поступила 16.04.2021

Принята после доработки 11.05.2021

Опубликована 20.10.2021

ASSESSMENT OF NUCLEAR MATERIAL ELIMINATION BY DIFFERENT METHODS OF DERMIS DECELLULARIZATION

Karina I. Melkonyan¹, Tatyana V. Rusinova¹, Yana A. Kozmai^{1*}, Alevtina S. Asyakina^{1,2}

¹ Kuban State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia
350063, Russian Federation, Krasnodar, Mitrofan Sedina Str., 4

² Kuban State University
350040, Russian Federation, Krasnodar, Stavropolskaya Str., 149

We carry out a comparative assessment of the degree of nuclear material disintegration and elimination in the samples of decellularized porcine dermis after using chemical, detergent and enzymatic decellularization methods. Decellularized dermis materials are promising materials as wound dressings. The chemical method (Protocol No. 1) was performed using NaOH and H₂O₂ solutions; the detergent method (Protocol No. 2) involved the solutions of Triton X-100 and sodium deoxycholate in combination with Na₂-EDTA; the enzymatic method (Protocol No. 3) was based on the solutions of trypsin Versene and porcine pan-

creatic DNase. Subsequently, we analyzed the DNA amount in decellularized and native dermis (control group) samples. The results of this analysis showed positive results in all three protocols. It was found that the detergent method have advantages over other methods of producing decellularized dermis matrices.

Keywords: decellularization, dermal wound dressings, nuclear material, detergent treatment, enzymatic method, chemical method

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Melkonyan K.I., Rusinova T.V., Kozmai Y.A., Asyakina A.S. Assessment of Nuclear Material Elimination by Different Methods of Dermis Decellularization. *Journal Biomed.* 2021;17(3E):59–63. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-59-63>

Submitted 16.04.2021

Revised 11.05.2021

Published 20.10.2021

Введение

В последние годы для решения проблемы нехватки донорских органов используется технология децеллюляризации. В её основе лежит разрушение клеточных мембран, органоидов и ядерного материала, в результате чего остаётся внеклеточный матрикс (ВКМ) [3]. Такой матрикс имеет трёхмерную структуру обескелеченной ткани и не обладает антигенной нагрузкой [6], что делает его перспективным материалом для использования в трансплантологии [4]. Особенно актуальным в настоящее время является создание децеллюляризованных дермальных матриксов, которые могут быть применены в ожоговой терапии и пластической хирургии.

Для проведения децеллюляризации могут применяться различные способы: физические, химические, детергентные и ферментативные [2, 5]. К физическим относят механическую и ультразвуковую обработку и заморозку/оттаивание; к химическим — воздействие щелочами и кислотами, а также гипертоническими солевыми растворами; в качестве детергентов могут использоваться ионные (дезоксихолат натрия, додецил сульфат натрия, Тритон-Х200), неионные (Тритон-Х100) и цвиттер-ионные (CHAPS, сульфобетайны) детергенты, к ферментам — трипсин, папаин и различные нуклеазы [2]. Стоит отметить, что различные методики и реагенты воздействуют

на ткани определённым образом, с чем связаны возможные негативные последствия децеллюляризации (например, нарушение биологических свойств матриксов в связи с нарушением их структурной организации). В связи с этим имеется необходимость подбора оптимального методики децеллюляризации, эффективность которой может быть охарактеризована с помощью оценки содержания оставшихся компонентов клеток, например ДНК [1].

Таким образом, **целью** нашего исследования является сравнительная оценка эффективности элиминации ядерного материала после химической, детергентной и ферментативной децеллюляризации дермы свиньи.

Материалы и методы

Основой для создания БМ была нативная кожа поросёнка (самец, возраст 2 мес.) породы Ландрас массой 13,4 кг, полученного из учебно-производственного комплекса «Пятачок» на базе Кубанского государственного аграрного университета. Животное наркотизировали растворами золетила (Zoletil 100, 1 мг/кг) и ксилазина (Rometar, «Spofa», 4 мл/кг). Животное содержалось в стационарной клетке, индивидуально. В качестве корма применялся стандартный комбикорм гранулированный полнорационный для свиней КК 56. Водопроводная очищенная вода давалась в поилках *ad libitum*. Животные содержались в контролируемых

условиях окружающей среды: температура воздуха — 18–22°C, относительная влажность — 60–70%. Освещение в помещениях — естественно-искусственное, 12-часовой световой цикл. Образцы дермы толщиной 0,5 мм брали после предварительного механического удаления эпителиального слоя электродерматомом в стерильных условиях. Образцы дермы хранили при –80°C. Протокол исследования был одобрен локальным этическим комитетом (протокол № 96 от 29.01.2021).

При децеллюляризации по Протоколу № 1 (химический метод) образец дермы при температуре 25°C обрабатывали смесью 5% р-ра NaOH («Вектон», РФ) и 3% р-ра H₂O₂ («Иодные Технологии и Маркетинг», РФ) в соотношении 1:1 в течение 17 ч, затем отмывали в дистиллированной воде и нейтрализовали 1 н. H₂SO₄. По Протоколу № 2 дерму помещали в деионизированную воду на 4 ч. Затем проводили 2 цикла обработки 1% Тритоном X-100 («Sigma Aldrich», США) и 4% р-ром дезоксихолата натрия («Sigma Aldrich», США) в комбинации с 0,002 М Na₂-ЭДТА общей продолжительностью 12 ч при комнатной температуре в шейкере-инкубаторе (170 об./мин). При каждой смене растворов образцы отмывали деионизированной водой в течение 10 мин. По Протоколу № 3 размороженную дерму инкубировали в течение 6 ч (3 цикла по 2 ч) при 37°C в р-ре трипсина-Версена («Биолот», Россия). Затем с целью удаления ядерного материала клеток образцы инкубировали в р-ре свиной панкреатической ДНКазы («Sigma Aldrich», США; 2000 ЕД в 200 мл фосфатного буфера) при 37°C в течение 4 ч. Между циклами также проводилась отмывка образцов деионизированной водой.

Количественное определение содержания ДНК выполняли на спектрофотометре NanoDrop ND-1000 («Thermo Fisher Scientific Inc», США) с использованием набора реагентов («Dneasy Blood and Tissue Kit»,

«Qiagen», Швеция) по протоколу фирмы-изготовителя. Статистическая обработка полученного материала производилась с использованием пакета программ MS Excel, v6.0, GraphPad Prism version 6.04. Результаты исследований оценены с использованием t-критерия Стьюдента. Доверительный интервал рассчитывался по таблице распределения Стьюдента. Достоверными признавались различия при значениях $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

В результате использования различных протоколов обесклевывания были получены образцы децеллюляризированной дермы. Количественный анализ показал, что содержание ДНК в полученных образцах после обработки по всем протоколам снижалось примерно в три раза по сравнению с содержанием в нативной дерме свиньи (рис.). При этом содержание ДНК в образцах, полученных химическим методом (Протокол № 1), по сравнению с данными образцов, обработанных детергентным и ферментативным методами (Протоколы № 2 и № 3 соответственно), было повышено на 18,05 и 26,05% соответственно.

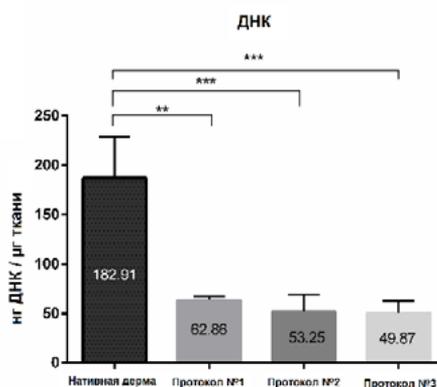


Рис. Количественный анализ содержания ДНК в нативной и децеллюляризированной различными методами дерме свиньи. ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$.

Fig. Quantitative DNA analysis in native and decellularized porcine dermis by various methods. ** — $p < 0.01$; *** — $p < 0.001$.

Полученные результаты иллюстрируют эффективность обесклевывания по Протоколам № 2 и № 3, с помощью которых из клеточных матриц был успешно удалён ядерный материал до требуемых для децеллюляризации и успешной имплантации показателей (~50 нг/мг ткани) [1, 2].

Выводы

Несмотря на различные подходы к децеллюляризации дермы, использованные нами методики показывают удовлетворительные результаты по количественному содержанию нуклеиновых кислот в матриксах. Тем не менее, хотя наилучшие ре-

зультаты показал ферментативный метод, являющийся наиболее «мягким» методом обесклевывания, стоит отметить, что этот метод наиболее дорогостоящий, что значительно увеличивает стоимость получаемых материалов. В связи с этим наиболее перспективным методом децеллюляризации выступает детергентный метод, показавший большую эффективность при элиминации ДНК дермы. Однако необходимо отметить, что химический метод при дальнейшей разработке, направленной на более эффективное разрушение ядерного материала, позволит существенно снизить себестоимость получаемых дермальных матриц.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Максяткина Л.В., Абагов Н.Т., Ахмалтдинова Л.Л., Бадьров Р.М., Трошин В.В. Применение биоимплантов при пластике дефектов передней брюшной стенки. *Вестник Казахского Национального медицинского университета*. 2019;1:304–309. [Maksyatkina L.V., Abatov N.T., Ahmaltidinova L.L., Badyrov R.M., Troshin V.V. Primenenie bioimplantov pri plastike defektov peredney bryushnoy stenki [The use of bioimplants for plastic surgery of defects of the anterior abdominal wall]. *Bulletin of the Kazakh National Medical University*. 2019;1:304–309. (In Russian)].
2. Срапо Р.М., Gilbert T.W., Badylak S.F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*. 2011;32(12):3233–3243. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.01.057
3. Duisit J., Maistriaux L., Bertheuil N., Lellouch A.G. Engineering vascularized composite tissues by perfusion decellularization/recellularization: Review. *Current Transplantation Reports*. 2021;8(2):1–13. DOI: 10.1007/s40472-021-00317-2.
4. Faulk D.M., Badylak S.F. Natural biomaterials for regenerative medicine applications. *Regenerative Medicine Applications in Organ Transplantation*. 2014;8:101–112. DOI: 10.1016/B978-0-12-398523-1.00008-2.
5. Hussein K.H., Park K.M., Teotia P.K., Yang J.W., Kim H.M., Honq S.H., Yang S.R., Park I.C., Park S.M., Woo H.M. Fabrication of a biodegradable xenoantigen-free rat liver scaffold for potential drug screening applications. *Transplantation Proceedings*. 2013;45(8):3092–3096. DOI: 10.1016/B978-0-12-398523-1.00008-2.
6. Keane T.J., Swinehart I.T., Badylak S.F. Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance. *Methods*. 2015;84:25–34. DOI: 10.1016/j.ymeth.2015.03.005.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Мелконян Карина Игоревна, к.м.н., ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России;
e-mail: kimelkonian@gmail.com

Karina I. Melkonyan, Cand. Sci. (Med.), Kuban State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: kimelkonian@gmail.com

Русинова Татьяна Викторовна, к.б.н., ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России;
e-mail: rusinova.tv@mail.ru

Tatyana V. Rusinova, Cand. Sci. (Biol.), Kuban State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: rusinova.tv@mail.ru

Козмай Яна Андреевна*, ФГБОУ ВО
«Кубанский государственный медицинский
университет» Минздрава России;
e-mail: yana.kozmay@gmail.com

Yana A. Kozmai*, Kuban State Medical University
of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: yana.kozmay@gmail.com

Асякина Алевтина Сергеевна, ФГБОУ ВО
«Кубанский государственный медицинский
университет» Минздрава России; ФГБОУ ВО
«Кубанский государственный университет»;
e-mail: alevtina.asyakina@mail.ru

Alevtina S. Asyakina, Kuban State Medical
University of the Ministry of Health Care of Russia;
Kuban State University;
e-mail: alevtina.asyakina@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

<https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-64-69>



АНЕСТЕЗИЯ САМОК МЫШЕЙ ПРИ ХИРУРГИЧЕСКОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ЭМБРИОНОВ

Н.С. Огнева*, Е.С. Савченко, Л.А. Табоjackova

ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»
143442, Российская Федерация, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, 1

Подбор адекватной комбинации препаратов для анестезии самок мышей при хирургической трансплантации эмбрионов является важной частью процесса, т. к. недостаточная глубина наркоза или влияние нежелательных эффектов на организм самки и эмбрион могут привести к неудовлетворительному результату эксперимента. В нашей работе мы используем сочетание двух препаратов для анестезии животного: Золетил 100 и Медитин, а также Антиседан сразу после трансплантации для более быстрого выхода из наркоза.

Ключевые слова: анестезия, хирургическая трансплантация, мыши, золетил 100, медитин, антиседан

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Огнева Н.С., Савченко Е.С., Табоjackova Л.А. Анестезия самок мышей при хирургической трансплантации эмбрионов. *Биомедицина*. 2021;17(3E):64–69. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-64-69>

Поступила 19.04.2021

Принята после доработки 11.06.2021

Опубликована 20.10.2021

ANESTHESIA OF FEMALE MICE DURING SURGICAL EMBRYO TRANSFER

Nastasya S. Ogneva*, Elena S. Savchenko, Lidiya A. Taboyakova

Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia
143442, Russian Federation, Moscow Region, Krasnogorsk District, Svetlye Gory Village, 1

The selection of an adequate combination of drugs for anesthesia of female mice during surgical embryo transfer is an important part of the process, since insufficient depth of anesthesia or the influence of undesirable effects on the pregnant female and the embryo can lead to unsatisfactory results of the experiment. In our work, we use a combination of 2 drugs for anesthesia of an animal: Zoletil 100 and Meditin, as well as Antisedan immediately after transplantation for a faster recovery from anesthesia.

Keywords: anesthesia, surgical embryo transfer, mice, zoletil 100, meditin, antisedan

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Ogneva N.S., Savchenko E.S., Taboyakova L.A. Anesthesia of Female Mice During Surgical Embryo Transfer. *Journal Biomed*. 2021;17(3E):64–69. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-64-69>

Submitted 19.04.2021

Revised 11.06.2021

Published 20.10.2021

Введение

С незапамятных времён люди пытались найти средства, чтобы облегчить мучительную боль, или гуманный способ провести даже самую элементарную операцию. В разных странах были свои подходы к обезболиванию, например в древнем Египте делали лекарства на основе опиума, в Китае пользовалась популярностью смесь вина и растёртой в порошок конопли, индейцы жевали листья коки и капали насыщенной слюной на рану больному. С развитием естественных наук к концу XVIII века стали появляться такие вещества, как эфир, хлороформ, закись азота. 30 марта 1842 года Кроуфордом Лонгом была произведена первая в мире операция по удалению опухоли затылка с применением эфирного наркоза. А после публичной демонстрации операции под эфиром 16 октября 1846 года врачи со всего мира поняли, что хирургические операции могут быть безболезненными и немучительными для пациента. Именно с этого знаменательного дня, по мнению историков, зародилась наука — анестезиология [6, 7]. В настоящее время под анестезией понимают обратимое угнетение центральной нервной системы, сопровождающееся комплексом клинических признаков, таких как отсутствие сознания, болевой чувствительности, значительное подавление рефлекторных реакций в организме и снижением тонуса скелетных мышц. Достигнуть такого широкого спектра эффектов, как правило, невозможно при использовании одного препарата, поэтому главной задачей анестезиолога является рациональный подбор комбинации препаратов в каждом индивидуальном случае.

Особенной осторожности требует работа с беременными и планируемыми беременностью. Поскольку влияние лекарств на плод трудно поддаётся изучению в связи с этическими аспектами, важно минимизировать лекарственную нагрузку, чтобы

не нарушить наступление беременности и развитие плода. В биомедицинских исследованиях при проведении хирургической трансплантации эмбрионов в яйцевод самки-реципиентки важно подобрать оптимальную схему наркотизирования, обеспечивающую не только глубокую седацию и обезболивание во время операции, чтобы не подвергать губительному стрессу животное, но и быстрое прекращение действия нежелательных эффектов на организм будущей матери и эмбрион. Исходя из этих принципов в нашей работе мы используем комбинацию наиболее новых и селективных препаратов Золетил 100 («Virbac», Франция) и Медитин («Api-San», Россия) для наркотизирования самки, а также Антиседан («Orion Pharma», Финляндия), сразу после проведения хирургической манипуляции, что способствует снятию нежелательных эффектов на организм мыши и быстрому выходу из наркоза благодаря антагонистическому действию Антиседана на Медитин.

Золетил 100 представляет собой смесь двух действующих веществ — золазепам гидрохлорида и тилетамина гидрохлорида — в равной дозировке 250 мг. Тилетамина гидрохлорид является диссоциативным анестетиком. Благодаря антагонизму к NMDA-рецепторам он блокирует передачу глутамата, являющегося возбуждающим нейротрансмиттером. Действие тилетамина основано на функционально-электрофизиологической диссоциации между таламокортикальной и лимбической системами, вследствие которой происходит подавление болевой чувствительности, но сознание и рефлексы сохранены [3, 10]. Золазепам относится к группе бензодиазепинов, обладающих анксиолитической, противосудорожной, мышечно-расслабляющей и амнестической активностью. Механизм действия препарата связан с его взаимодействием с бензодиазепиновыми рецепторами, за счёт которого повышает-

ся аффинитет ГАМК к ГАМК α -рецепторам и усиливается тормозное влияние ГАМК на организм (рис. 1). Миорелаксация достигается благодаря угнетению спинальных полисинаптических рефлексов [1, 8]. Комбинация данных препаратов основана на неспособности тилетамина подавлять рефлексы и угнетать сознание, а золазепам — полностью устранять болевую чувствительность.

Медитин (медетомидин) стимулирует периферические и центральные $\alpha 2$ -адренорецепторы, обладает более селективным действием по сравнению с его предшественником, ксилазином, что позволяет уменьшить лекарственную нагрузку на организм самки. $\alpha 2$ -агонисты имеют широкий спектр терапевтических действий, главными из которых является глубокая седация и анальгезия. Анксиолитический эффект достигается благодаря стимуляции постсинаптических $\alpha 2$ -адренорецепторов

голубого пятна ствола головного мозга и, как следствие, увеличению выброса норадреналина по всей коре головного мозга. Анальгетический эффект достигается активацией пресинаптических норадренергических $\alpha 2$ -рецепторов дорсальных рогов спинного мозга (рис. 2) [2, 4, 5].

Комбинация данных препаратов обеспечивает максимальный уровень седации и обезболивания при минимальных дозировках каждого отдельного лекарственного средства, что сокращает частоту и тяжесть побочных эффектов на организм животного.

Для прекращения действия $\alpha 2$ -агонистов на организм животного в практике используются два различных лекарственных вещества — йохимбин и атипамезол. Йохимбин является алкалоидом коры западноафриканского дерева *Corynanthe*. Как показывают исследования зарубежных коллег, избирательность действия йохимбина ниже, чем у атипамезола и, соответственно, бо-

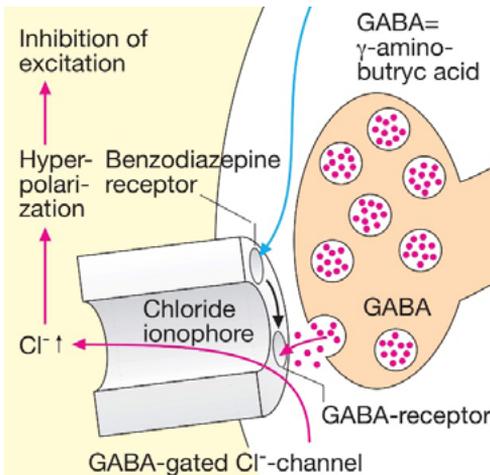


Рис. 1. Схема воздействия бензодиазепинов на организм. Синей стрелкой показано действие золазепам на бензодиазепиновый рецептор, вследствие активации которого происходит каскад реакций, приводящих к подавлению возбуждения [10].

Fig. 1. Scheme of the effects of benzodiazepines on the body. The blue arrow shows the effect of zolazepam on the benzodiazepine receptor; as a consequence of the activation of which a cascade of reactions occurs, leading to suppression of excitation [10].

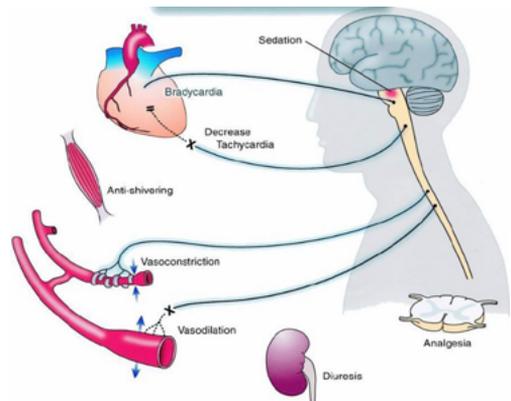


Рис. 2. Схема воздействия $\alpha 2$ -агонистов на организм [12].

Fig. 2. Scheme of the effects of $\alpha 2$ -agonists on the body [12].

Таблица. Факторы оценки выхода мышей из наркоза (период наркотизирования в минутах), $n=10$, $p=0,01$
Table. Factors for assessing the recovery of mice from anesthesia (period of anesthesia in minutes), $n=10$, $p=0.01$

Фактор / Группа животных	Золетил + Медитин	Золетил + Медитин + Антиседан
Учащение дыхания	20±0,54	2±0,30
Положительная реакция на зажатие хвоста пинцетом	30±0,51	2±0,40
Мышечные сокращения	40±0,78	5±0,36
Некоординированные движения	120±3,77	15±0,52

лее низкие показатели в скорости и качестве пробуждения животного из наркоза. Антиседан (атипамезол) разработан как антидот медетомидина, его коэффициент избирательности $\alpha 2:\alpha 1$ составляет 8500:1 соответственно. Благодаря антагонистическому действию на $\alpha 2$ -рецепторы подавляется выброс норадреналина и, как следствие, прекращаются эффекты, вызванные медетомидином [9, 11].

Целью работы явилась оценка эффективности подобранной нами схемы наркотизирования при хирургической трансплантации эмбрионов.

Материалы и методы

В работе использовались 20 самок-гибридов первого поколения (F1) CBA/lac × C57BL/6Y в возрасте 6 недель, полученных из филиала «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России и содержащихся в барьерной системе «Rair Iso System» со свободным доступом к воде и пище, при температуре воздуха 21–23°C и световом режиме 12/12 ч.

Для оценки эффективности подобранной нами схемы наркотизирования животные были разделены на две группы по 10 самок в каждой. Первой группе внутривенно вводилась комбинация препаратов Золетил 100 в дозе 12,5 мг/кг и Медитин в дозе 1 мг/кг, второй группе дополнительно, спустя 10 мин, подкожно вводился препарат Антиседан в дозе 2,5 мг/кг.

Глубина наркоза оценивалась визуально по отсутствию движений у мыши и отрицательной реакции на болевой раздражитель

в виде зажатия хвоста пинцетом. После введения всех препаратов оценивался выход из наркоза по четырём показателям в обеих группах по времени.

Результаты исследований

После внутривенного введения комбинации препаратов Золетил 100 и Медитин мыши обеих групп входили в наркоз в течение 3–5 мин, реакции на зажатие хвоста пинцетом не отмечалось ни у одной мыши. Как показывают результаты (табл.), введение Антиседана ускоряет выход мышей из наркоза почти в 10 раз по сравнению с группой, не получающей его после введения Золетила и Медитина, что подтверждает целесообразность выбранной нами схемы наркотизирования.

Заключение

Под анестезией подразумевается целый комплекс клинических проявлений, в связи с чем квалифицированному анестезиологу необходимо подобрать оптимальную комбинацию препаратов и их дозировку для каждого конкретного случая. При хирургической трансплантации эмбрионов в яйцевод самки-реципиента стресс, вызванный недостаточной глубиной анестезии или дискомфортом во время и после операции, может приводить к прерыванию беременности или недостаточному развитию материнского инстинкта после рождения потомства, что приведёт к гибели новорождённых и, как следствие, неудовлетворительному результату исследования.

Нами установлено, что применение двухкомпонентного наркоза Золетил 100 +

Медитин в дозе 12,5 мг/кг и 1 мг/кг, соответственно, обеспечивает глубокую седацию и анальгезию у мышей во время операции, а дополнительное введение Антиседана

в дозе 2,5 мг/кг способствует в разы более быстрому выходу животных из наркоза, что благоприятно отражается на физиологическом состоянии матери и эмбриона.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Каркищенко В.Н., Каркищенко Н.Н., Шустов Е.Б. *Фармакологические основы терапии. Тезаурус: Руководство для врачей и студентов*. Издание третье — новая редакция. М., СПб.: Айсинг, 2018:288. [Karkischenko V.N., Karkischenko N.N., Shustov E.B. *Farmakologicheskie osnovy terapii [Pharmacological basics of therapy]*. Thesaurus. 3rd ed. Moscow, Saint-Petersburg: Ajsing Publ., 2018:288. (In Russian)].
2. Козлов И.А. Агонист α_2 -адренорецепторов дексметомидин в практике современной седации. *Общая реаниматология*. 2013;9(2):55–65. [Kozlov I.A. Agonist α_2 -adrenoretseptorov deksetometomidin v praktike sovremennoy sedatsii [The α_2 -adrenoceptor agonist dexmedetomidine in current sedation practice]. *Obshaya reanimatologia [Common reanimatology]*. 2013;9(2):55–65. (In Russian)].
3. Корнюшенков Е.А. Диссоциативные анестетики в клинике мелких домашних животных. *Российский ветеринарный журнал*. Мелкие домашние и дикие животные. 2015;3:38–41. [Kornuyshenkov E.A. Dissotsiatiivnye anestetiki v klinike melkikh domashnikh zhivotnykh [Dissociative anesthetics in the small animal clinic]. *Rossiyskiy veterinarnyy zhurnal. Melkie domashnie i dikiye zhivotnye [Russian veterinary journal. Small domestic and wild animals]*. 2015;3:38–41. (In Russian)].
4. Корнюшенков Е.А. Применение Медитина (медетомидина) в качестве компонента седации. *Российский ветеринарный журнал*. 2017;5:30–33. [Kornuyshenkov E.A. Primenenie Meditina (medetomidina) v kachestve komponenta sedatsii [Application of Meditin (medetomidine) as a component of sedation]. *Russian veterinary journal*. 2017;5:30–33. (In Russian)].
5. Мальцева А.Н. Препараты для анестезии — что важно знать врачу. *VetPharma*. 2017;1(35):40. [Mal'tseva A.N. Preparaty dlya anesteziy — chto vazhno znat' vrachu [Anesthetics: What doctor should know]. *VetPharma*. 2017;1(35):40. (In Russian)].
6. Мороз В.В., Васильев В.Ю., Кузовлев А.Н. Исторические аспекты анестезиологии-реаниматологии. *Общая реаниматология*. 2006;2(2):59–67. [Moroz V.V., Vasilyev V.Yu., Kuzovlev A.N. Istoricheskie aspekty anesteziologii-reanimatologii [Anesthesiology — Reanimatology: Historical Aspects]. *Obshchaya reanimatologiya [General Reanimatology]*. 2006;2(2):59–67. (In Russian)]. DOI: 10.15360/1813-9779-2006-2-59-67.
7. Попов А.С., Экстрем А.В., Шлахтер С.М., Тириченко Д.С. История анестезиологии и реаниматологии как клиническая и научная дисциплины. *Волгоградский научно-медицинский журнал*. 2013;4(40):10–13. [Popov A.S., Extrem A.V., Shlachter S.M., Tirichenko D.S. Istoriya anesteziologii i reanimatologii kak klinicheskaya i nauchnaya distsipliny [Anesthesiology and resuscitation history as clinical and scientific disciplines]. *Volgograd Medical Scientific Journal*. 2013;4(40):10–13. (In Russian)].
8. Харкевич Д.А. *Фармакология*. Учебник. 12-е изд., М.: ГЭОТАР-Медиа, 2017:760. [Harkevich D.A. *Farmakologiya [Pharmacology]*. Textbook. 12th ed. Moscow: GEOTAR-Media Publ., 2017:760. (In Russian)].
9. Janssen C.F., Maiello P., Wright M.J. Jr, Kracinovsky K.B., Newsome J.T. Comparison of atipamezole with yohimbine for antagonism of xylazine in mice anesthetized with ketamine and xylazine. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 2017;56(2):142–147.
10. Lüllmann H., Mohr K., Ziegler A., Bieger D. *Color Atlas of Pharmacology*. 2nd ed., revised and expanded. Stuttgart — New York: Thieme, 2000:386.
11. Mees L., Fidler J., Kreuzer M., Fu J., Pardue M.T., García P.S. Faster emergence behavior from ketamine/xylazine anesthesia with atipamezole versus yohimbine. *PLoS One*. 2018;13(10):e0199087. DOI: 10.1371/journal.pone.0199087.
12. <https://www.creative-biolabs.com/static/img/ADRA2A-Membrane-Protein-Introduction.png>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Огнева Настасья Сергеевна*, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: ognevanastya@mail.ru

Nastasya S. Ogneva*, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: ognevanastya@mail.ru

Савченко Елена Сергеевна, ФГБУН
«Научный центр биомедицинских технологий
ФМБА России»;
e-mail: savelaine@gmail.com

Elena S. Savchenko, Scientific Center
of Biomedical Technologies of the Federal Medical
and Biological Agency of Russia;
e-mail: savelaine@gmail.com

Табоякова Лидия Александровна, ФГБУН
«Научный центр биомедицинских технологий
ФМБА России»;
e-mail: lida-vet@mail.ru

Lidiya A. Taboyakova, Scientific Center
of Biomedical Technologies of the Federal Medical
and Biological Agency of Russia;
e-mail: lida-vet@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

<https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-70-75>



ОСОБЕННОСТИ ОРГАНИЗАЦИИ СОДЕРЖАНИЯ И ВЫВЕДЕНИЯ ТРАНСГЕННЫХ ЛИНИЙ МЫШЕЙ В НЦБМТ ФМБА РОССИИ

Н.В. Петрова*, М.М. Скрипкина

ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»
143442, Российская Федерация, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, 1

Проанализированы особенности мониторинга здоровья и поддержания линий трансгенных мышей. Отработана методика содержания животных в лабораторных условиях, охарактеризованы критерии инбредного разведения гомозиготных трансгенных линий мышей. Полученные данные могут быть полезны сотрудникам вивария для поддержания трансгенной линии мышей.

Ключевые слова: трансгенные мыши, лабораторные животные, инбредное скрещивание, криоконсервация, гомозиготные линии, наследование признаков

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Петрова Н.В., Скрипкина М.М. Особенности организации содержания и выведения трансгенных линий мышей в НЦБМТ ФМБА России. *Биомедицина*. 2021;17(3E):70–75. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-70-75>

Поступила 13.05.2021

Принята после доработки 01.08.2021

Опубликована 20.10.2021

MAINTENANCE AND BREEDING OF TRANSGENIC MOUSE STRAINS AT THE SCIENTIFIC CENTER OF BIOMEDICAL TECHNOLOGIES OF THE FMBA OF RUSSIA

Nataliya V. Petrova*, Mariya M. Skripkina

Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia
143442, Russian Federation, Moscow Region, Krasnogorsk District, Svetlye Gory Village, 1

In this article, we analyze the specifics of health monitoring and maintenance of transgenic mouse strains. A method for keeping animals in laboratory conditions is discussed, the criteria for inbred crossing of homozygous transgenic mice lines are characterized. The obtained data can be useful for the staff of vivaria in maintaining the transgenic line of mice.

Keywords: transgenic mice, laboratory animals, inbred crossing, cryopreservation, homozygous lines, inheritance of traits

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Petrova N.V., Skripkina M.M. Maintenance and Breeding of Transgenic Mouse Strains at the Scientific Center of Biomedical Technologies of the FMBA of Russia. *Journal Biomed.* 2021;17(3E):70–75. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-70-75>

Submitted 13.05.2021

Revised 01.08.2021

Published 20.10.2021

Введение

В настоящее время исследование базовых и прикладных биомедицинских вопросов невозможно без проведения исследовательских работ на лабораторных животных, где особенная роль отведена генетически модифицированным организмам.

Реализация разработки изменённых на геномном уровне мышей внесла большой вклад в изучение разных заболеваний человека. Мышь — животное с небольшим периодом беременности (19–22 дня), между человеком и мышью выявлено удивительное сходство молекулярных процессов. В связи с получением анализа геномов мыши и человека стали осуществимы сопоставимые генетические исследования. Поэтому можно смело заявлять, что на геномном уровне трансгенные мыши считаются ведущей экспериментальной моделью для исследований. Конечно, есть некоторые ограничения на использование мышинной модели при изучении таких болезней, как, например, сердечно-сосудистые заболевания, однако из-за простоты генетических манипуляций с мышами данная модель считается стандартным трамплином для проверки гипотез и прогнозирования экспериментов на животных значительно крупнее [5].

У лабораторных мышей существуют наиболее благоприятные и неблагоприятные периоды для спаривания, они классифицируются на следующие стадии: диэструс, проэструс, эструс, метаэструс.

Характеристика стадий эструса лабораторных мышей

Лабораторные мыши могут плодиться круглый год. Эстральный цикл (цикл течки) самок продолжается 4–5 дней, чувствителен к свету: охота (стадия эструса) у самок может наступить через 3–5 ч с приближением ночи. При непрерывном освещении у самок может наступить постоянная стадия эструса, что способно спровоцировать

поликистоз яичников. Поэтому в виварии чётко следует соблюдать цикл дня и ночи.

Работая с лабораторными мышами, также следует учитывать следующие биологические особенности:

- эффект Брюса — беременность не начинается, если к самочке в течение дня и ночи после скрещивания в клетку сажают другого самца. Феромоны чужого самца предупреждают имплантацию зародышей. Спустя 4–5 дней у подобных самок возобновляется эструс. Самцы, кастрированные до половозрелости, подобный эффект не вызывают.

- эффект Ли — Бута — при содержании самок группами больше четырёх голов без случки прослеживается огромное количество мнимых беременностей из-за женских феромонов. При нахождении в более крупных группах, например до 30 особей, самочки имеют все шансы войти в анэструс.

- внутри систем, которые можно назвать «гаремами», самочки часто группируются по мёты сходного возраста и заботятся о них вместе. Отсчёт беременности у мышей начинается с момента образования копуляционной пробки. Длительность лактации — примерно 21 сут. Если зачатие произошло в период лактации и выращивания потомства, беременность может затянуться до 26–28 дней [1].

Инбредное разведение гомозиготных трансгенных линий мышей

Размножение лабораторных животных осуществляют по типу узкого инбридинга в два этапа: 1-й этап — работа с племенным ядром и 2-й — ступенчатое расширенное воспроизводство для использования в экспериментах (племенное стадо). В данной работе мы говорим о первом варианте.

Племенным ядром линии является группа животных, которая состоит из размножающихся пар репродуктивного возраста (родных братьев и сестёр) в соотношении

1 самец / 1 самка. В границах племенного стада к одному самцу подсаживают двух самок. Необходимо учитывать инбредный возраст каждого гнезда. Все рождённые от первого поколения (F1) инбредного разведения потомки (помёт) числятся вторым поколением (F2), при спаривании которого появляется третье поколение (F3) и т. д. Представленные генетико-селекционные процедуры считаются основными, чтобы исключить возможность генетической контаминации и утраты гомозиготности рядов.

Развитие племенных ядер гомозиготных трансгенных линий мышей

Для сохранения любой трансгенной линии составляют порядка 8–12 целевых гнёзд, которые при отбраковке одного из родителей подвергаются восстановлению за счёт подсадки особи из помёта данной трансгенной линии, достигшей половой зрелости и находящейся в непосредственных родственных связях. Целевые гнёзда по окончании репродуктивного возраста (примерно 7–8 мес.) должны подвергаться выбраковке (эвтаназия с дальнейшей утилизацией).

При падеже самки или самца в целевом гнезде, что является признаком нежизнеспособности, гнездо выбраковывается полностью. При селекции мышей, придерживаясь инбридинга, целесообразно осуществлять возвратное скрещивание каждой трансгенной линии с контрольной линией — мыши дикого типа, для получения гетерозиготных животных. Впоследствии приобретённых гетерозиготных самцов и самок используют с целью создания гнёзд для становления потомства, состоящего из 25% мышей дикого типа, 50% — гетерозигот и 25% — гомозиготных особей в одном помёте. Данных мышей маркируют и генотируют для дальнейшего формирования новых гнёзд между гомозиготными особями. Представленная операция осуществляется с регулярностью один раз в 1–2 года [3].

Мыши каждого последующего поколения передаются в возрасте от 3 до 5 недель на ПЦР-диагностику и секвенирование для верификации редактирования генов (рис. 1).

Цель работы — изучение и внедрение принципов выведения и поддержания

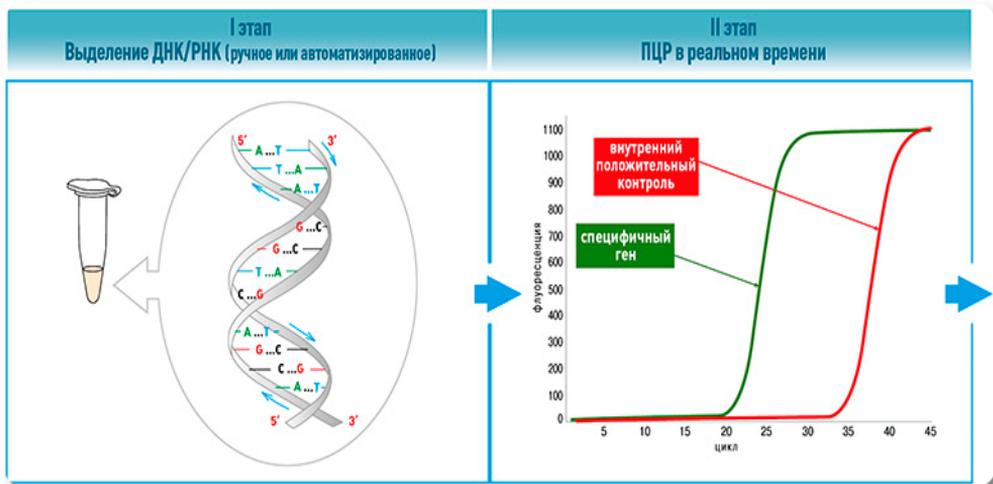


Рис. 1. Схематические этапы и результаты ПЦР-анализа.

Fig. 1. Schematic steps and results of PCR analysis.

трансгенных животных в НЦБМТ ФМБА России.

Материалы и методы

Лаборатория постгеномных технологий ФГБУН НЦБМТ ФМБА России проводит свою научно-исследовательскую работу начиная с 2019 года. В виварии лаборатории выполняются следующие работы:

- 1) уход и содержание мышей;
- 2) проведение операций (вазэктомия), для которых используются самцы линии Balb/c;

- 3) микроинъекции для получения животных-прародителей (поколения F0), на межлинейных гибридных самках-донорах и реципиентах CBA×C57BL/6;

- 4) гистерэктомия для получения животных SPF-статуса (свободных от патогенной микрофлоры) на самках межлинейных гибридов CBA×C57BL/6, линий Balb/c, C57BL/6;

- 5) выведение гомозиготных линий мышей.

Условия содержания грызунов соответствуют ГОСТ 33216-2014 и требованиям FELASA (the Federation of European Laboratory Animal Science Associations — Европейская Федерация по работе с лабораторными животными).

При ненадлежащем температурном режиме в виварном помещении у мышей может ухудшаться состояние шерстного покрова, поэтому температура четко контролируется и поддерживается в пределах 21–24°C. При групповом содержании температура в клетках со сплошным дном чаще бывает выше комнатной, и даже при хорошо работающей вентиляции может превышать её на 6°C. Особое внимание следует уделять поддержанию температуры в комнатах, где находятся системы с индивидуальными вентилируемыми клетками.

Материал для строительства гнёзд и домики позволяют животным самостоятельно контролировать микроклимат и даёт возможность создавать законченное закрытое

гнездо. Однако когда беременная самка находится в стрессе и строит слишком высокое гнездо при помощи опилок и ваты под полкой, возникает высокая вероятность затопления гнезда. Состояние самок следует прогнозировать, и при обнаружении признаков стресса вместо ваты класть бумагу, предварительно простерилизованную в сухожаре. Клетки и материалы, используемые для обогащения среды, должны позволять животным проявлять нормальное поведение и снижать вероятность возникновения конфликтных ситуаций.

Шум, издаваемый не только людьми, но и лабораторным оборудованием, в т. ч. капаящими кранами, колёсиками тележек, компьютерными мониторами и т. д., может стать причиной аномального поведения, нарушений репродуктивного цикла у животных. Поэтому в периоды, когда животные находятся вне своих клеток (во время чисток, гормональных обработок, вынужденной изоляции, на карантине после прибытия из питомника), уровень постороннего шума должен быть сведён к минимуму.

Результаты и их обсуждение

В настоящее время в виварии лаборатории содержится 14 трансгенных линий животных — как F20 поколения, так и формирующееся F0 поколение.

По нашим наблюдениям, трансгенные мыши чрезвычайно уязвимы и чувствительны к условиям окружающей среды, в связи с чем нами был разработан поддерживающий рацион кормления, включающий дозированный ввод витаминов С и В (в комплексе), зелень и рыбную/мясокостную/кровяную муку, семечки, мел.

Также нами был определён оптимальный температурный режим обработки кормов и опилок, исходя из оценки состояния здоровья животных. Температура обработки увеличена до 150°C, длительность обработки составляет 40–50 мин.

Относительная влажность в помещениях для содержания мышей должна поддерживаться в диапазоне 45–65%.

Несмотря на необходимость поддержания высоких гигиенических норм, может оказаться целесообразным оставлять животным некоторое количество запаховых меток. Поэтому мы избегаем частой чистки клеток при содержании беременных самок и самок с потомством, т. к. причиняемое беспокойство может стать причиной поедания потомства самкой или нарушения её материнского поведения [2, 4].

Сотрудниками Центра непрерывно ведётся фактическая схема наследования трансгена — «дерево наследования» (рис. 2), оно является основным способом визуализации генетических признаков животных.

Дальнейшие перспективы работы

С целью получения мышей SPF-статуса нами также изучена и отработана данная технология получения и выращивания лабораторных животных в изоляторной системе.

Одно из перспективных направлений — криоконсервация биологического материала мышей инбредных линий и создание

криобанка [6]. Поддержание мышинных биомоделей в виде живых колоний затруднительно по экономическим причинам и постоянно несёт потенциальные риски, в т. ч. чрезмерные потери из-за вспышек различных заболеваний, прекращения размножения и сбоев оборудования. В связи с чем стали внедряться криохранилища, чтобы сократить популяционную нагрузку на действующие виварии и снизить необходимость строительства новых объектов. Криоконсервация — очень мощный инструмент, позволяющий управлять колониями, одновременно защищая их от потери и гарантируя, что они останутся доступны по требованию.

Выводы

Лабораторные мыши являются неотъемлемой частью научной экспериментальной практики благодаря сходству молекулярных процессов с человеческими. Они являются наиболее доступными в приобретении, считаются надёжными моделями. При этом они имеют ряд определённых физиологических и психологических особенностей, которые необходимо учитывать и корректировать своевременным монито-

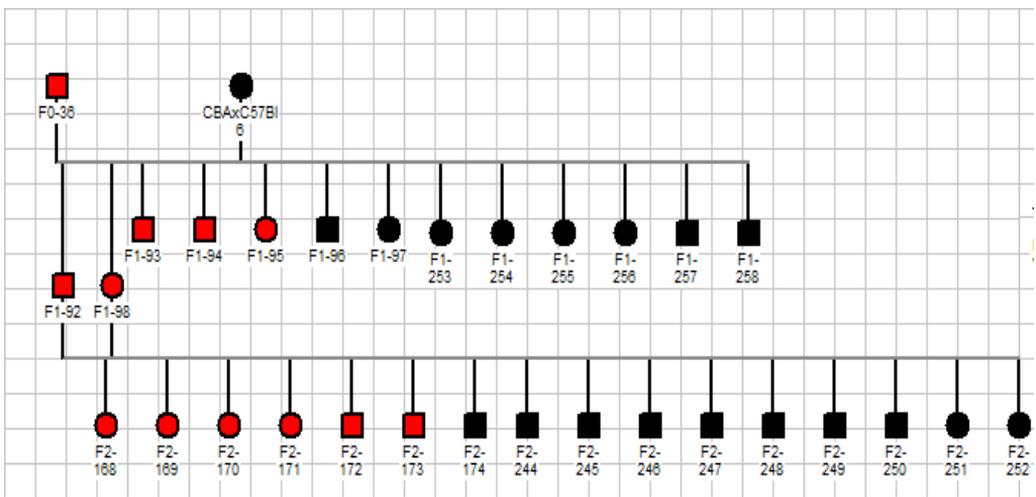


Рис. 2. Элемент генетического дерева мышей трансгенной линии.

Fig. 2. Element of the genetic tree of transgenic mice.

рингом состояния и правильными условиями содержания.

Генетически модифицированные линии мышей нулевого поколения, полученные путём микроинъекции, по нашим данным, являются более чувствительными к среде обитания. Для них потребовалось усовер-

шенствовать систему содержания, исходя из современных представлений. Вследствие улучшения качества жизни мы получаем повышение уровня здоровья, что отражается на производительности и рождаемости животных. Наша задача не только вывести, но и сохранить трансгенных мышей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Аверина О.А., Сергиев П.В. Виды колоний лабораторных грызунов в исследованиях *in vivo*. Институт функциональной геномики МГУ, 2020. [Averina O.A., Sergiev P.V. *Vidy koloniy laboratornykh gryzunov v issledovaniyakh in vivo* [Species of laboratory rodent colonies in vivo studies]. Institute of Functional Genomics of the Moscow State University, 2020. (In Russian)].
2. ГОСТ 33216-2014. Межгосударственный стандарт. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами. [GOST 33216-2014. *Mezhhgosudarstvennyy standart. Rukovodstvo po soderzhaniyu i ukhodu za laboratornymi zhiivotnymi. Pravila soderzhaniya i ukhoda za laboratornymi gryzunami i krolnikami* [GOST 33216-2014. *Interstate standard. Guidelines for the maintenance and care of laboratory animals. Rules for the maintenance and care of laboratory rodents and rabbits*]. (In Russian)].
3. Петрова Е.С., Громова А.В., Анисименко М.С., Рубан Л.А., Егорова С.А., Петровская И.Ф., Амстиславская Т.Г., Липина Т.В. Поддержание генетически модифицированных линий мышей: вклад в развитие биокolleкций в России. *Лабораторные животные для научных исследований*. 2018;2:2–15. [Petrova E.S., Gromova A.V., Anisimenko M.S., Ruban L.A., Egorova S.A., Petrovskaya I.F., Amstislavskaya T.G., Lipina T.V. Podderzhanie geneticheski modifitsirovannykh liniy myshey: vklad v razvitiye biokollektsiy v Rossii [Maintenance of genetically modified mouse strains: Contribution to the development of biocollections in Russia]. *Laboratornye zhiivotnye dlya nauchnykh issledovaniy* [Laboratory animals for scientific research]. 2018;2:2–15. (In Russian)]. DOI: 10.29926/2618723X-2018-02-01.
4. <https://www.bbt-lab.com/>
5. <https://meduniver.com/Medical/cardiologia/1365.html>
6. <https://resources.jax.org/colony-management/cryopreservation-a-cool-way-to-stretch-your-research-dollars>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Петрова Наталья Владимировна*, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;

e-mail: m-sklad@yandex.ru

Скрипкина Мария Михайловна, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;

e-mail: skripkina.fmba@gmail.com

Nataliya V. Petrova*, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: m-sklad@yandex.ru

Mariya M. Skripkina, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: skripkina.fmba@gmail.com

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author



СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ ПОЛУЧЕНИЯ ЭКСОСОМ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В БИМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Н.И. Пономарева^{1,2,*}, А.П. Костюшева¹, С.А. Брезгин¹, В.В. Смирнов², В.И. Гегечкори²,
Д.С. Костюшев^{1,3}, В.П. Чуланов^{1,2}

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии
и инфекционных заболеваний» Минздрава России
127473, Российская Федерация, Москва, ул. Достоевская, 4, к. 2

² ФГАУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова»
Минздрава России (Сеченовский Университет)
119991, Российская Федерация, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

³ Научно-технологический университет «Сириус»
354340, Российская Федерация, Сочи, Олимпийский просп., 1

Экзосомы — наноразмерные мембранные везикулы, которые секретируются почти всеми видами клеток и стабильно существуют в организме. Благодаря уникальным свойствам они могут быть использованы в биомедицинских исследованиях в качестве лекарственных препаратов и как платформа для направленной доставки лекарственных средств. В данном исследовании был разработан протокол получения внеклеточных везикул из культуральной жидкости с использованием анионообменной хроматографии. Созданный протокол превосходит наиболее используемый протокол выделения экзосом ультрацентрифугированием за счёт возможности выделения из больших объёмов культуральной среды.

Ключевые слова: внеклеточные везикулы, экзосомы, анионообменная хроматография, ультрацентрифугирование, доставка лекарств

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 20-15-00373.

Для цитирования: Пономарева Н.И., Костюшева А.П., Брезгин С.А., Смирнов В.В., Гегечкори В.И., Костюшев Д.С., Чуланов В.П. Сравнение методов получения экзосом, используемых в биомедицинских исследованиях. *Биомедицина*. 2021;17(3E):76–79. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-76-79>

Поступила 16.04.2021

Принята после доработки 31.05.2021

Опубликована 20.10.2021

COMPARISON OF EXOSOME ISOLATION METHODS FOR BIOMEDICAL RESEARCH

Natalia I. Ponomareva^{1,2,*}, Anastasia P. Kostyusheva¹, Sergey A. Brezgin¹,
Valery V. Smirnov², Vladimir I. Gegechkory², Dmitry S. Kostyushev^{1,3}, Vladimir P. Chulanov^{1,2}

¹ National Medical Research Center for Phthiopulmonology and Infectious Diseases
of the Ministry of Health Care of Russia
127473, Russian Federation, Moscow, Dostoevskaya Str., 4, Building 2

² I.M. Sechenov Moscow State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia
119991, Russian Federation, Moscow, Trubetskaya Str., 8, Building 2

³ Sirius University of Science and Technology
354340, Russian Federation, Sochi, Olimpiyskiy Avenue, 1

Exosomes are nanoscale membrane vesicles secreted by almost all kinds of cells and stably existing in the body. Due to their unique properties, exosomes can be used in biomedical research as regenerative preparations or drug delivery vehicles. In this study, an anion exchange (AIEX) chromatography-based protocol for isolation of extracellular vesicles from a cell-conditioned medium was developed. The exosome isolation method based on AIEX chromatography overperforms the canonical ultracentrifugation-based isolation method in terms of its capability of large-volume processing.

Keywords: extracellular vesicles, exosomes, anion exchange chromatography, ultracentrifugation, drug delivery

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

Funding: this work was supported by the Russian Science Foundation Grant No. 20-15-00373.

For citation: Ponomareva N.I., Kostyusheva A.P., Brezgin S.A., Smirnov V.V., Gegechkory V.I., Kostyushev D.S., Chulanov V.P. Comparison of Exosome Isolation Methods for Biomedical Research. *Journal Biomed.* 2021;17(3E):76–79. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-76-79>

Submitted 16.04.2021

Revised 31.05.2021

Published 20.10.2021

Введение

В настоящее время экзосомы проходят клинические испытания в терапии аутоиммунных заболеваний и как средство регенеративной медицины благодаря своей иммуномодулирующей и противовоспалительной активности. Также исследуется применение экзосом в качестве носителя для доставки лекарственных препаратов и как метода «жидкой биопсии» для ранней диагностики онкопатологий и мониторинга противоопухолевой терапии [5]. Экзосомы представляют собой внеклеточные везикулы диаметром 30–150 нм с билипидной мембраной, аналогичной мембранам клеток. Экзосомы подвергаются фагоцитозу клетками на моделях *in vitro* и *in vivo*, после чего происходит высвобождение содержимого экзосом (белков, нуклеиновых кислот) [1, 2].

Возможность продукции в производственных масштабах и безопасность использования, а также уникальные свойства экзосом (биосовместимость, способность проникать через биологические барьеры, иммуномодулирующее действие и низкий макрофагальный клиренс) определяют высокие перспективы их применения в медицине и фармации. С другой стороны, выделение экзосом из различных биоло-

гических жидкостей организма и последующее изучение их белкового и липидного состава и экзосомальных РНК позволяют выявлять патологические процессы в организме человека (например, злокачественную трансформацию клеток).

Усовершенствование методов выделения экзосом из различных биологических жидкостей и культуральной среды клеток необходимо для дальнейшего развития исследований в области применения внеклеточных везикул для диагностики и терапии [3, 4, 6].

Материалы и методы

Экзосомы были выделены из культуральной жидкости мезенхимных стромальных/стволовых клеток (МСК) и клеток почки эмбриона человека (НЕК293Т) при помощи двух различных методов получения внеклеточных везикул: (1) классического метода ультрацентрифугирования, (2) анионообменной хроматографии.

Анионообменную хроматографию проводили на приборе BioRad BioLogic LP с использованием анионообменной смолы MacroPrep DEAE Media («BioRad», США).

Характеризация экзосом осуществлялась методом динамического светорассеяния (определение размера и дзета-потенциала

частиц) и методом вестерн-блоттинга (определение экзосомальных маркеров CD63, CD81, HSP70).

Результаты исследований

Сравнительный анализ методов выделения экзосом показал, что внеклеточные везикулы, полученные с помощью анионообменной хроматографии (AIEХ), имели средний размер, равный 100 нм, а дзета-потенциал экзосом, выделенных оптимизированным методом AIEХ, составлял $\approx -12,5$ мВ. Данные параметры сопоставимы с аналогичными характеристиками частиц, полученных классическим методом ультрацентрифугирования. Вестерн-блот-анализ изолятов внеклеточных везикул

подтвердил наличие основных маркеров, характерных для экзосом (CD63, CD81, HSP70).

Заключение

Усовершенствован протокол получения экзосом при помощи анионообменной хроматографии. Данный метод позволяет получать внеклеточные везикулы из больших объемов жидкости (до десятков литров) для масштабирования выделения экзосом. Частицы, полученные с помощью разработанного метода, по характеристикам соответствуют экзосомам и сопоставимы с внеклеточными везикулами, выделенными при помощи ультрацентрифугирования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Haraszti R.A., Didiot M.C., Sapp E., et al. High-resolution proteomic and lipidomic analysis of exosomes and microvesicles from different cell sources. *J. Extracell Vesicles*. 2016;5:32570. DOI: 10.3402/jev.v5.32570.
2. Liu D., Yang F., Xiong F., Gu N. The smart drug delivery system and its clinical potential. *Theranostics*. 2016;6(9):1306–1323. DOI: 10.7150/thno.14858.
3. Mol E.A., Goumans M.J., Doevendans P.A., Sluijter J.P.G., Vader P. Higher functionality of extracellular vesicles isolated using size-exclusion chromatography compared to ultracentrifugation. *Nanomedicine*. 2017;13(6):2061–2065. DOI: 10.1016/j.nano.2017.03.011.
4. Patel G.K., Khan M.A., Zubair H., et al. Comparative analysis of exosome isolation methods using culture supernatant for optimum yield, purity and downstream applications. *Sci. Rep.* 2019;9:5335. DOI: 10.1038/S41598-019-41800-2.
5. Théry C., Zitvogel L., Amigorena S. Exosomes: Composition, biogenesis and function. *Nat. Rev. Immunol.* 2002;2(8):569–579. DOI: 10.1038/nri855.
6. Witwer K.W., Buzás E.I., Bemis L.T., Bora A., Lässer C., Lötvall J., Nolte-’t Hoen E.N., Piper M.G., Sivaraman S., Skog J., Théry C., Wauben M.H., Hochberg F. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J. Extracell Vesicles*. 2013;2. DOI: 10.3402/jev.v2i0.20360.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Пономарева Наталья Игоревна*, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» Минздрава России; ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет); e-mail: ponomareva.n.i13@yandex.ru

Костюшева Анастасия Павловна, к.б.н., ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» Минздрава России; e-mail: kostyusheva_ap@mail.ru

Natalia I. Ponomareva*, National Medical Research Center for Phthisiopulmonology and Infectious Diseases of the Ministry of Health Care of Russia; I.M. Sechenov Moscow State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia; e-mail: ponomareva.n.i13@yandex.ru

Anastasia P. Kostyusheva, Cand. Sci. (Biol.), National Medical Research Center for Phthisiopulmonology and Infectious Diseases of the Ministry of Health Care of Russia; e-mail: kostyusheva_ap@mail.ru

Брезгин Сергей Алексеевич, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» Минздрава России;
e-mail: seegez@mail.ru

Смирнов Валерий Валерьевич, к.фарм.н., доц., ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет);
e-mail: vall@mail.mipt.ru

Гегечкори Владимир Ираклиевич, к.фарм.н., ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет);
e-mail: vgegechkori@gmail.com

Костюшев Дмитрий Сергеевич, к.б.н., ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» Минздрава России; Научно-технологический университет «Сириус»;
e-mail: dkostushev@gmail.com

Чуланов Владимир Петрович, д.м.н., ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» Минздрава России; ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет);
e-mail: vladimir@chulanov.ru

Sergey A. Brezgin, National Medical Research Center for Phthisiopulmonology and Infectious Diseases of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: seegez@mail.ru

Valery V. Smirnov, Cand. Sci. (Pharmaceutic.), Assoc. Prof., I.M. Sechenov Moscow State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: vall@mail.mipt.ru

Vladimir I. Gegechkory, Cand. Sci. (Pharmaceutic.), I.M. Sechenov Moscow State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: vgegechkori@gmail.com

Dmitry S. Kostyushev, Cand. Sci. (Biol.), National Medical Research Center for Phthisiopulmonology and Infectious Diseases of the Ministry of Health Care of Russia; Sirius University of Science and Technology;
e-mail: dkostushev@gmail.com

Vladimir P. Chulanov, Dr. Sci. (Med.), National Medical Research Center for Phthisiopulmonology and Infectious Diseases of the Ministry of Health Care of Russia; I.M. Sechenov Moscow State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: vladimir@chulanov.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author



СРАВНЕНИЕ СПОСОБОВ ХИРУРГИЧЕСКОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ЭМБРИОНОВ МЫШИ ПСЕВДОБЕРЕМЕННЫМ САМКАМ-РЕЦИПИЕНТАМ

Е.С. Савченко^{1*}, Н.С. Огнева¹, С.В. Максименко¹, О.Б. Жукова²

¹ ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»
143442, Российская Федерация, Московская обл., Красногорский район, п. Светлые горы, 1

² Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии
и питания животных — филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ
имени академика Л.К. Эрнста»
249013, Российская Федерация, Калужская обл., Боровск, п. Институт

На результат переноса эмбрионов псевдобеременным самкам-реципиентам могут оказывать влияние многие факторы, в т. ч. и сама процедура трансплантации. Для определения возможной роли способа хирургической трансплантации на результат переноса был проведён анализ данных трансплантации 6715 эмбрионов, выживших после микроинъекции генно-инженерной конструкции, в яйцевод 471 псевдобеременной самки-реципиента тремя способами — в воронку яйцевода, в ампулярную часть посредством прокола или разреза мышечной стенки яйцевода. Было показано значительное увеличение уровня беременности реципиентов, а также общего уровня рождаемости в группах после прокола/разреза яйцевода, однако уровень рождаемости среди беременных реципиентов не имеет различий между экспериментальными группами. Выживаемость новорождённых также существенно выше в группах, где перенос эмбрионов осуществлялся посредством прокола/разреза яйцевода.

Ключевые слова: гуманизированные трансгенные мыши, микроинъекции в пронуклеусы, трансгеноз, трансплантация эмбрионов, уровень рождаемости

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Савченко Е.С., Огнева Н.С., Максименко С.В., Жукова О.Б. Сравнение способов хирургической трансплантации эмбрионов мыши псевдобеременным самкам-реципиентам. *Биомедицина*. 2021;17(3E):80–88. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-80-88>

Поступила 03.05.2021

Принята после доработки 17.05.2021

Опубликована 20.10.2021

COMPARISON OF METHODS OF SURGICAL TRANSPLANTATION OF MICE EMBRYOS INTO PSEUDOPREGNANT FEMALE RECIPIENTS

Elena S. Savchenko^{1*}, Nastasya S. Ogneva¹, Sergey V. Maksimenko¹, Olga B. Zhukova²

¹ Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia
143442, Russian Federation, Moscow Region, Krasnogorsk District, Svetlye Gory Village, 1

² All-Russian Research Institute of Physiology, Biochemistry and Animal Nutrition — Branch of the Federal
Scientific Center of Animal Husbandry — The All-Russian Institute of Animal Husbandry named after
academician L.K. Ernst
249013, Russian Federation, Kaluga Region, Borovsk, Institut Village

There are a lot of factors that are able to influence the result of embryo transfer to pseudopregnant females, including the transplantation procedure itself. To determine the possible role of the surgical transplantation method on the embryo transfer result, we analyzed the data of transplantation of 6715 microinjected embryos into the oviduct of 471 pseudopregnant female by three ways — into the infundibulum, into the ampullae by the oviduct muscular wall puncture or incision. A significant increase in the pregnancy rate of recipients, as well as the birth rate in total recipients in oviduct puncture/incision groups, has been shown, however, the birth rate in pregnant recipients does not differ between all experimental groups. Survival of pups is also significantly higher in oviduct puncture/incision groups.

Keywords: humanized transgenic mice, pronuclear microinjection, transgenesis, embryo transfer, birth rate

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Savchenko E.S., Ogneva N.S., Maksimenko S.V., Zhukova O.B. Comparison of Methods of Surgical Transplantation of Mice Embryos into Pseudopregnant Female Recipients. *Journal Biomed.* 2021;17(3E):80–88. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-80-88>

Submitted 03.05.2021

Revised 17.05.2021

Published 20.10.2021

Введение

Получение трансгенных животных для различных медико-биологических исследований — одно их наиболее быстро развивающихся направлений современной науки. Одним из наиболее широко применяемых методов получения трансгенных организмов является модификация зигот методом инъекции генно-инженерной конструкции в мужской пронуклеус. Данный метод состоит из четырёх основных этапов: получение эмбрионов, проведение микроинъекций, трансплантация выживших потенциально модифицированных эмбрионов самкам-реципиентам и анализ полученного потомства и выявление особей, несущих искомую модификацию генома. В данной статье мы детально остановимся на описании третьего этапа — переносе эмбрионов в репродуктивный тракт реципиента.

Трансплантация эмбрионов после микроинъекций генно-инженерной конструкции, как правило, осуществляется хирургическим методом на стадии зиготы или двух бластомеров непосредственно в яйцевод самки-реципиента. Перенос эмбрионов возможен и на более поздних стадиях (морула/бластоциста), однако этот метод чаще применяется для трансплантации эмбрио-

нов после витрификации или для переноса химерных бластоцист после инъекции стволовых клеток. Методика выполнения трансплантации эмбрионов реципиентам требует от исследователей особой аккуратности и значительных навыков микрохирургии. На исход операции могут оказывать влияние множество факторов, таких как качество эмбрионов, количество переносимых эмбрионов, генетический фон самок-реципиентов, попадание крови в репродуктивный тракт, развитие воспалительного процесса вследствие переноса эмбрионов, присутствие среды культивирования или заноса микроорганизмов в процессе операции, стресс (недостаточная глубина наркоза, болевые ощущения после операции и пр.), медикаментозная нагрузка и индивидуальная чувствительность к применяемому наркозу, развитие гипотермической реакции и многие другие [4–5, 6, 8, 9, 11, 12]. Особое значение имеет подбор оптимальной схемы анестезии, которая обеспечивает оптимальный уровень седации и аналгезии [4, 6], а также возможность достаточно быстрого вывода животных из наркоза для предотвращения развития гипотермии и негативного влияния используемых медикаментозных пре-

паратив на эмбрионы. В литературе [13] также описана возможность нехирургической трансплантации эмбрионов на стадии бластоцисты непосредственно в рог матки псевдобеременной самки-реципиента на подходящей стадии цикла (день 1–3 псевдобеременности). Относительная лёгкость и быстрота, нетравматичность процедуры (не требует хирургического вмешательства) и отсутствие медикаментозной нагрузки (применение наркоза) на организм реципиентов делает метод нехирургической трансплантации весьма привлекательным для исследователей. Однако длительное культивирование эмбрионов *in vitro*, а также сама процедура микроинъекции негативно сказываются на качестве эмбрионов: выход бластоцист уменьшается, они имеют сниженную жизнеспособность, поскольку часть бластоцист имеет в составе уменьшенное количество клеток, что отражается на их способностях к имплантации [2].

Классическая методика переноса эмбрионов псевдобеременным самкам-реципиентам предполагает трансплантацию эмбрионов через разрез капсулы яичника непосредственно в воронку яйцевода. Данная процедура требует особой аккуратности, с одной стороны, чтобы не повредить многочисленные кровеносные сосуды капсулы и не травмировать сам яичник, с другой стороны, чтобы не допустить обратного выхода трансплантированных эмбрионов через воронку в брюшную полость. Модификацией данного метода является перенос эмбрионов в ампулярную часть яйцевода посредством прокола или небольшого разреза мышечной стенки яйцевода. Данные способы переноса эмбрионов, в отличие от классического, связаны с меньшим хирургическим вмешательством и, соответственно, со снижением дискомфорта реципиентов, как во время, так и после операции, что соответствует современным стандартам GLP (Good Laboratory Practice), а также со снижением вероят-

ности потери эмбрионов: за счёт наличия продольных и поперечных гладкомышечных волокон в стенке яйцевода, края прокола/разреза быстро смыкаются, плотно запечатывая эмбрионы внутри. В данной работе представлен ретроспективный анализ сравнения результатов хирургической трансплантации эмбрионов мыши разными способами в яйцевод псевдобеременных самок-реципиентов.

Материалы и методы

Экспериментальные животные

В эксперименте использовались самки гибридных мышей линии СВА/Лас × С57BL/6Y (F1) в возрасте 4 недель (самки-доноры эмбрионов) и 1,5 мес. (самки-реципиенты), полученные из филиала «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Животные содержались в закрытой системе при световом режиме 12/12, со свободным доступом к еде и воде.

Получение эмбрионов

Для вызывания суперовуляции самкам в возрасте 4 недели внутрибрюшинно вводили 5 МЕ гонадотропина сыворотки жеребой кобылы (Сергон, Чехия), а через 47–50 ч — 5 МЕ хорионического гонадотропина человека («Московский эндокринный завод», Россия) и подсаживали к плодовитым самцам на ночь. Утром отбирали самок с копулятивными пробками. Забой животных производили дислокацией шейных позвонков. Извлечение эмбрионов и проведение микроинъекций проводили в среде M2 («Sigma-Aldrich», США).

Микроинъекции генно-инженерной конструкции

Микроинъекции проводили на установке, включающей инвертированный микроскоп, оснащённый оптикой для контрастирования живых неокрашенных объектов («Nikon», объективы NAMC и DIC) и комплектом манипуляторов и автоматическим

микроинъектором (Eppendorf). В эксперименте использованы самодельные стеклянные инструменты (пипетки для удерживания эмбрионов и иглы для микроинъекций). Поскольку эмбрионы в нашей лаборатории были получены для создания нескольких гуманизированных трансгенных линий мышей, различные линейризованные ДНК-конструкции вводили в мужской пронуклеус зигот через микроиглу с внешним диаметром 1,5–2 мкм. Генно-инженерная конструкция содержалась в буфере TE для инъекций (10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 7,4). Рабочая концентрация составляла 5–6 нг/мкл. Зиготы, не разрушившиеся после микроинъекции, были поставлены на культивирование в среде M16 («Sigma-Aldrich») в инкубатор с 5% CO₂ при постоянной температуре 37°C.

Трансплантация эмбрионов

Для синхронизации цикла и получения достаточного количества особей, находящихся в подходящей фазе полового цикла (эструс), к моменту посадки их к вазэктомированным самцам самки-реципиенты также получали гормональные препараты по схеме, описанной выше, но, в отличие от доноров, получали сниженную дозировку препаратов (2,5 МЕ), чтобы избежать синдрома гиперстимуляции яичников и нарушений в функциональном слое эндометрия матки, которые значительно снижают возможность успешной имплантации и дальнейшего развития эмбрионов [1]. Для трансплантации отбирали самок с копулятивными пробками, свидетельствующими об успешном покрытии вазэктомированным самцом. Перенос эмбрионов осуществлялся на стадии двух бластомеров хирургическим методом в правый яйцевод наркотизированной самки-реципиента с помощью стеклянной пипетки. Трансплантация осуществлялась тремя способами: классическим способом в воронку яйцевода и непосредственно в ампулу

через прокол (стерильной иглой 29G/30G, между яичником и ампулой, в направлении ампулярной части яйцевода) или небольшой разрез стенки яйцевода (ножницы GILLS-VANNAS для капсулотомии, между яичником и ампулой, на небольшом удалении от ампулы). В одну самку переносилось 12–20 эмбрионов в минимальном количестве среды M2. Для анестезии использована комбинация препаратов Zoletyl 100 («Virbac», Франция) и Рометар («Biovet», Чехия) из расчёта 12,5 мг/кг и 5 мг/кг соответственно. Для ускорения выхода животных из наркоза реципиентам сразу после трансплантации вводили Антиседан («Orion Pharma», Финляндия) из расчёта 2,5 мг/кг.

Схема эксперимента

Всего нами было трансплантировано 6715 потенциально модифицированных эмбрионов 471 псевдобеременной самке-реципиенту. В зависимости от типа хирургической трансплантации, было проанализировано 3 группы реципиентов: группа 1 — трансплантация производилась в воронку яйцевода (n=284, 3772 эмбриона трансплантировано); группа 2 — трансплантация в ампулу через прокол яйцевода (n=106, 1669 эмбрионов трансплантировано) и группа 3 — трансплантация в ампулу через разрез яйцевода (n=81, 1274 эмбриона трансплантировано). Сравнение групп производили по следующим параметрам: уровень беременности (количество родивших реципиентов / количество реципиентов, взятых на трансплантацию), выживаемость потомства (количество выживших мышат / количество рождённых мышат), среднее количество потомков на самку, общий уровень рождаемости (количество живых мышат / всего трансплантировано эмбрионов) и уровень рождаемости среди беременных реципиентов (количество живых мышат / всего трансплантировано эмбрионов беременным самкам).

Статистический анализ

Уровень беременности, выживаемость потомства, общий уровень рождаемости и уровень рождаемости среди беременных реципиентов попарно сравнивали между экспериментальными группами, используя χ^2 -критерий (угловое преобразование) Фишера (LibreOffice Calc 4.2.8.2). Различия между группами считали статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,001$.

Результаты и их обсуждение

Проведённый анализ результатов хирургической трансплантации эмбрионов (табл.) после микроинъекции генетических конструкций различными способами показал, что уровень беременности в группах с менее инвазивной процедурой трансплантации (группа 2 и группа 3) достоверно выше ($p < 0,0001$), чем при трансплантации эмбрионов классическим методом в воронку яйцевода (41,5 и 50,6% против 20,8% соответственно). Уровень рождаемости среди всех реципиентов, в среднем, в два раза выше в группах 2 и 3 (в 1,9 и 2,25 раза соответственно), что согласуется с данными об уровне беременности. Отличия по показателю общего уровня беременности в группах 2 и 3 по сравнению с группой 1 достоверны при уровне значимости $p < 0,0001$. Полученные данные позволяют сделать вывод, что способ переноса эмбрионов оказывает непосредственное влияние на результат операции. Перенос эмбрионов в воронку яйцевода предполагает нарушение целостности капсулы яичника, что влечёт за собой высокую вероятность повредить кровеносные сосуды на её поверхности или сам яичник. Развившееся в этом случае кровотечение осложняет процедуру переноса эмбрионов, увеличивает время операции и приводит к развитию воспалительного процесса, что негативно отражается на дальнейшем развитии эмбрионов, а также на физическом состо-

янии самой реципиентки — кровопотеря и наличие воспалительного очага являются факторами, снижающими вероятность наступления беременности. Присутствие крови в трубной жидкости вместе с эмбрионами приводит к их агрегации и гибели [3]. Успешность переноса эмбрионов в воронку яйцевода во многом зависит и от особенностей анатомического строения конкретно взятой реципиентки: слишком короткий участок яйцевода в пределах капсулы яичника, неудобное положение или сомкнутые края воронки значительно затрудняют процедуру переноса. При трансплантации эмбрионов в ампулу посредством прокола или разреза яйцевода мы нивелируем большинство недостатков трансплантации через воронку: а) отсутствие крупных кровеносных сосудов делает процедуру более безопасной и менее травматичной, предпосылки для развития кровотечения и воспалительного процесса, а также для агрегации эмбрионов, минимальные; б) возможность эмбриолога выбрать удобное место для прокола/разреза яйцевода — независимость от анатомических особенностей животного, уменьшение времени операции; в) перенос эмбрионов сразу в ампулу, минимальное нарушение целостности репродуктивного тракта и быстрое смыкание краёв прокола/разреза за счёт гладкомышечных волокон в стенке яйцевода позволяют снизить вероятность потери эмбрионов в процессе операции.

Сравнение уровня рождаемости среди беременных реципиентов не выявило статистически значимых отличий между экспериментальными группами. Значение этого параметра колеблется в пределах 22–24%. Полученные результаты дают основания полагать, что трансплантация эмбрионов в ампулу посредством прокола или разреза яйцевода приводит к увеличению доли беременных реципиентов, но не оказывает влияния на вероятность получения жизнеспособных потомков, т. е. процент живых

Таблица. Сравнение результатов трансплантации эмбрионов в экспериментальных группах
Table. Comparison of embryo transfer results between experimental groups

Экспериментальная группа	Уровень беременности (количество родивших реципиентов / количество реципиентов, взятых на трансплантацию)	Выживаемость потомства (количество выживших мышат / количество рождённых мышат)	Среднее количество потомков на самку (количество рождённых мышат / количество родивших реципиентов)	Среднее количество живых потомков на самку (количество рождённых живых мышат / количество родивших реципиентов)	Общий уровень рождаемости (количество живых мышат / всего трансплантировано на всем реципиентам эмбрионов)	Уровень рождаемости среди беременных реципиентов (количество живых мышат / всего трансплантировано эмбрионов беременным самкам)
Группа 1 (трансплантация в воронку яйцевода)	20,8% (59/284)	72,9% (191/262)	4,4 (262/59)	3,2 (191/59)	5,1% (191/3772)	24,0% (191/796)
Группа 2 (трансплантация в ампулу через прокол яйцевода)	41,5%* (44/106)	90,0%* (162/180)	4,1 (180/44)	3,7 (162/44)	9,7%* (162/1669)	23,4% (162/692)
Группа 3 (трансплантация в ампулу через разрез яйцевода)	50,6%* (41/81)	90,7%* (147/162)	4,0 (162/41)	3,6 (147/41)	11,5%** (147/1274)	22,5% (147/653)

Примечание: * — по сравнению с группой 1 (трансплантация в воронку) отличия достоверны при $p < 0,0001$; ** — по сравнению с группой 2 (трансплантация в ампулу через прокол яйцевода) отличия достоверны при $p < 0,055$.

Note: * — differences are significant for value $p < 0,0001$ in comparison with group 1 (embryo transfer into the infundibulum); ** — differences are significant for value $p < 0,055$ in comparison with group 2 (embryo transfer into the ampullae by the oviduct muscular wall puncture).

мышат, полученных после переноса эмбрионов среди беременных реципиентов. Таким образом, модификация способа переноса эмбрионов позволяет более чем в два раза снизить количество животных в эксперименте при сохранении эффективности получения жизнеспособных потомков. При этом снижается количество необходимых реципиентов, трансплантированных эмбрионов и, следовательно, пропорционально снижается и количество необходимых самок-доноров.

Выживаемость полученного потомства также имеет достоверные различия ($p < 0,0001$) среди экспериментальных групп. Так, в группах 2 и 3 она составляет порядка 90%, тогда как в группе 1 выживаемость составляет 72,9%. При этом среднее количество потомков на одну родившую самку выше в группе 1, тогда как среднее количество живых потомков на одну родившую самку самое высокое в группе 2, а самое низкое, наоборот, в группе 1 (4,4, 3,7 и 3,2 соответственно). Было отмечено, что вероятность успешного выкармливания малоплодного потомства (1–2 потомка) в группе 1 очень низкая, мы наблюдали лишь единичные случаи, когда такие мышата доживали до взрослого состояния. В группах 2 и 3 наблюдалась совершенно иная картина: мышата из малоплодных помётов более чем в 50% случаев успешно доживали до половозрелого состояния (данные не представлены). Исследования Lerch и соавт. показали, что трансплантация эмбрионов может влиять на психоэмоциональное состояние мышшей, причём не только самих самок-реципиентов, но и их потомства [7]. Исходя из полученных результатов, можно предположить, что подобные результаты могут быть связаны с более высоким уровнем стресса у реципиентов группы 1 (более травматичная операция, кровотечение, воспаление и пр.) и, как следствие, недостаточным развитием у самок-реципиентов материнского инстинкта.

Таким образом, использование менее инвазивной процедуры переноса эмбрионов позволяет свести к минимуму проявление основных факторов, влияющих на успешность трансплантации, что, в свою очередь, отражается на росте уровня беременности и уровня рождаемости, а также на выживаемости потомков.

Заключение

Использование животных в современных медико-биологических исследованиях подчинено жёстким критериям в рамках разработанных и принятых ВОЗ, Евросоюзом и многими странами законодательств, рекомендаций и стандартов по биоэтике, требований GLP (Good Laboratory Practice), которые актуальны и для экспериментов по получению генетически модифицированных организмов. Концепция «трёх R», сформулированная Russel W.M.S. и Burch R.L. [10], обосновывает принципы гуманного использования животных в экспериментах: Replacement — замена животных в эксперименте альтернативными подходами, Reduction — оптимум эффекта при минимуме животных и Refinement — исключение дискомфорта в содержании и эксперименте. Невозможность замены животных в ряде экспериментов предполагает следование по пути модификации существующих протоколов и/или разработки новых, предполагающих получение максимально высоких результатов при минимальном вовлечении и дискомфорте животных. В данном исследовании было показано, что небольшая модификация способа переноса эмбрионов позволяет более чем в два раза снизить количество животных, вовлечённых в эксперимент, при сохранении эффективности получения жизнеспособного потомства, а также значительно снизить дискомфорт животных во время и после хирургического вмешательства. В случае менее инвазивного способа трансплантации также наблюдается значитель-

ный рост выживаемости детёнышей, в т.ч. из малоплодных помётов. Значительное снижение необходимого количества животных в эксперименте снижает расход

материалов на содержание животных и используемых реактивов, а также позволяет получить результат за более короткий срок.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Айзятуллова Э.М., Носенко Е.Н., Волина В.В., Смолянинова Е.И., Айзятуллова Д.Р., Овсяник М.А. Динамика изменений в эндометрии и миометрии маток мышей при экспериментальном моделировании синдрома гиперстимуляции яичников и влияние на них терлипессина. *Архив клинической и экспериментальной медицины*. 2014;23(2):144–148. [Ayzyatulova E.M., Nosenko E.N., Volina V.V., Smolyaninova E.I., Ayzyatulova D.R., Ovsyanik M.A. Dinamika izmeneniy v endometrii i miometrii matok myshey pri eksperimental'nom modelirovaniy sindroma giperstimulyatsii yaichnikov i vliyaniye na nikh terlipessina [Dynamics of changes in the endometrium and myometrium of the uterus of mice during experimental modeling of ovarian hyperstimulation syndrome and the effect of terlipressin on them]. *Archives of Clinical and Experimental Medicine*. 2014;23(2):144–148. (In Russian)].
2. Вагина И.Н., Евсиков С.В., Соломко А.П. Факторы, определяющие готовность бластоцист мышей к имплантации. *Биополимеры и клетка*. 1997;13(2):161–167. [Vagina I.N., Evsikov S.V., Solomko A.P. Faktory, opredelyayushchie gotovnost' blastotsist myshey k implantatsii [Factors determining the readiness of mouse blastocysts for implantation]. *Biopolimery i kletka [Biopolymers and cells]*. 1997;13(2):161–167. (In Russian)].
3. Bermejo-Alvarez P., Park K.E., Telugu B.P. Utero-tubal embryo transfer and vasectomy in the mouse model. *J. Vis. Exp*. 2014;84:e51214. DOI: 10.3791/51214.
4. Gaertner D., Hallman T., Hankenson F., Batchelder M. *Anesthesia and analgesia in rodents*. In: Fish R., Brown M., Danneman P., Karas A., et al. *Anesthesia and analgesia in laboratory animals*. 2nd ed. London, UK: Academic, 2011:239–282.
5. Koblischke P., Kindahl H., Budik S., Aurich J., Palm F., Walter I., et al. Embryo transfer induces a subclinical endometritis in recipient mares which can be prevented by treatment with non-steroid anti-inflammatory drugs. *Theriogenology*. 2008;70:1147–1158. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2008.06.037.
6. Lamas S., Franquinho F., Morgado M., et al. C57BL/6J and B6129F1 embryo transfer: Unilateral and bilateral transfer, embryo number and recipient female background control for the optimization of embryo survival and litter size. *Animals*. 2020;10(8):1424. DOI: 10.3390/ani10081424.
7. Lerch S., Tolksdorf G., Schütz P., et al. Effects of embryo transfer on emotional behaviors in C57BL/6 mice. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci*. 2016;55(5):510–519.
8. Mahabir E., Volland R., Landsberger A., et al. Reproductive performance after unilateral or bilateral oviduct transfer of 2-cell embryos in mice. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci*. 2018;57(2):110–114.
9. Munné S., Alikani M., Tomkin G., Grifo J., Cohen J. Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. *Fertility and Sterility*. 1995;64(2):382–391. DOI: 10.1016/S0015-0282(16)57739-5.
10. Russell W.M.S., Burch R.L. The principles of humane experimental technique. *Med. J. Aust. [Internet]*. 1960;1(13):500.
11. Sarvari A., Naderi M.M., Sadeghi M.R., Akhondi M.M. A technique for facile and precise transfer of mouse embryos. *Avicenna J. Med. Biotechnol*. 2013;5(1):62–65.
12. Schlapp G., et al. Administration of the nonsteroidal anti-inflammatory drug tolfenamic acid at embryo transfer improves maintenance of pregnancy and embryo survival in recipient mice. *J. of Assisted Reproduction and Genetics*. 2015;32(2):271–275. DOI: 10.1007/s10815-014-0378-x.
13. Steele K.H., Hester J.M., Stone B.J., Carrico K.M., Spear B.T., Fath-Goodin A. Nonsurgical embryo transfer device compared with surgery for embryo transfer in mice. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci*. 2013;52(1):17–21.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Савченко Елена Сергеевна*, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: savelaine@gmail.com

Elena S. Savchenko*, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: savelaine@gmail.com

Огнева Настасья Сергеевна, ФГБУН
«Научный центр биомедицинских технологий
ФМБА России»;
e-mail: ognevanastya@mail.ru

Максименко Сергей Васильевич, к.б.н.,
ФГБУН «Научный центр биомедицинских тех-
нологий Федерального медико-биологического
агентства России»;
e-mail: vx136@rambler.ru

Жукова Ольга Борисовна, Всероссийский
научно-исследовательский институт физиоло-
гии, биохимии и питания животных — филиал
ФГБНУ «Федеральный научный центр животно-
водства — ВИЖ им. акад. Л.К. Эрнста»;
e-mail: olgazhukova19801031@gmail.com

Nastasya S. Ogneva, Scientific Center
of Biomedical Technologies of the Federal Medical
and Biological Agency of Russia;
e-mail: ognevanastya@mail.ru

Sergey V. Maksimenko, Cand. Sci. (Biol.),
Scientific Center of Biomedical Technologies
of the Federal Medical and Biological Agency
of Russia;
e-mail: vx136@rambler.ru

Olga B. Zhukova, All-Russian Research
Institute of Physiology, Biochemistry and Animal
Nutrition — Branch of the Federal Scientific Center
of Animal Husbandry — The All-Russian Institute
of Animal Husbandry named after academician
L.K. Ernst;
e-mail: olgazhukova19801031@gmail.com

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

<https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-89-94>



НЕПРЯМОЙ СУБМАКСИМАЛЬНЫЙ НАГРУЗОЧНЫЙ ТЕСТ РWC170 ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФИЗИЧЕСКОЙ РАБОТОСПОСОБНОСТИ НА СВЕТЛОГОРСКИХ МИНИ-СВИНЬЯХ

Н.В. Станкова*, М.А. Савина

ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»
143442, Российская Федерация, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, 1

Отработана и адаптирована методика проведения непрямого субмаксимального нагрузочного теста на светлогорских мини-свиньях в условиях лаборатории Центра. Определена физическая работоспособность животных, выявлены достоинства и недостатки данного теста.

Ключевые слова: светлогорские мини-свиньи, лабораторные животные, биомодели, физические работоспособность, нагрузочный тест PWC170

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Станкова Н.В., Савина М.А. Непрямой субмаксимальный нагрузочный тест PWC170 определения физической работоспособности на светлогорских мини-свиньях. *Биомедицина*. 2021;17(3E):89–94. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-89-94>

Поступила 03.05.2021

Принята после доработки 26.05.2021

Опубликована 20.10.2021

INDIRECT SUBMAXIMAL LOAD TEST PWC170 FOR DETERMINING PHYSICAL PERFORMANCE ON SVETLOGORSK MINI PIGS

Nataliia V. Stankova*, Mariya A. Savina

Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia
143442, Russian Federation, Moscow Region, Krasnogorsk District, Svetlye Gory Village, 1

A method for conducting an indirect submaximal load test on Svetlogorsk mini-pigs under laboratory conditions was developed and adapted. The physical performance of animals was assessed; the advantages and disadvantages of the developed method were discussed.

Keywords: Svetlogorsk mini-pigs, laboratory animals, biomodels, physical performance, load test PWC170

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Stankova N.V., Savina M.A. Indirect Submaximal Load Test PWC170 for Determining Physical Performance on Svetlogorsk Mini Pigs. *Journal Biomed*. 2021;17(3E):89–94. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-89-94>

Submitted 03.05.2021

Revised 26.05.2021

Published 20.10.2021

Введение

Физическая работоспособность — способность выполнять заданную работу с наименьшими физиологическими затратами с наивысшими результатами при определённой ЧСС. Определение уровня физической работоспособности позволяет судить о степени приспособления организма к нагрузке. Зависит от генетических факторов и тренировочного процесса. Важно знать уровень физической работоспособности, чтобы определить объём и интенсивность допустимой нагрузки. Определение физической работоспособности у животных позволит нам более однородно формировать группы животных и определить адекватную физическую нагрузку для исследований [4, 7].

В практике биомедицинских исследований физической выносливости и работоспособности животных стандартно используются два вида задаваемой физической нагрузки: беговая дорожка (тредбан) и плавательные тесты с нагрузкой в условиях повышенного уровня стресса. Поскольку плавание не представляется возможным, для мини-свиней мы используем обычную беговую дорожку с электродами [1, 2]. Такие исследования относятся к жёстким видам, в которых животные испытывают повышенный стресс, боль, а также рискуют получить травмы. Всё это отражается на психоэмоциональном состоянии, влияет на показатели биологических компонентов крови и мочи, ведёт к агрессии и угнетению животных, расходится с принципами гуманного отношения и проведения экспериментов с использованием лабораторных животных [6].

Цель нашего исследования была подобрать доступный нагрузочный тест определения физической работоспособности мини-свиней и отработать методику его проведения без риска нанести ущерб здо-

ровью животных и не подвергая их страданиям.

Для решения поставленной задачи мы обратились к литературе и изучили нагрузочные тесты, которые применяют в клинической и спортивной медицине.

Для определения физической работоспособности и аэробной производительности существуют прямые и непрямые методы исследования. Прямые методы предусматривают выполнение максимальных нагрузок, т. е. нагрузок, которые достигают границы аэробных способностей человека. Однако на современном этапе максимальные нагрузочные тесты не нашли широкого практического применения ни в спортивной медицине, ни тем более в клинике, поскольку они имеют длительный изнурительный характер, сопровождаются избыточным напряжением, которое может быть опасным для организма, т. е. связано с определённым риском. Кроме того, для проведения таких тестов требуется наличие сложной и достаточно дорогой аппаратуры.

Прямые методы используют преимущественно при обследовании спортсменов наивысшей квалификации, которые тренируются на выносливость, с целью выявления функциональных резервов для дальнейшего роста спортивных результатов, для комплектования сборной команды или в научных целях [3].

Из этого следует, что проведение прямых тестов в наших условиях невозможно. В клинической и спортивной медицине, особенно при массовых обследованиях, чаще всего применяют непрямые методы исследований, которые предусматривают выполнение нагрузок, требующих меньших усилий, то есть нагрузок субмаксимального уровня. Интенсивность субмаксимальных нагрузок обычно составляет 50–75% максимальных. Непрямые тесты рекомендуются экспертами Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) для самого широкого внедрения не только при обследовании

здоровых людей, но и больных, при условии достаточной компенсации функционального состояния кардио-респираторной системы. Для определения физической работоспособности среди непрямых методов исследования наибольшее распространение получил субмаксимальный нагрузочный тест PWC170 [3, 7]. На нём мы и остановили свой выбор.

Субмаксимальный тест PWC170 был разработан в Каролинском университете в Стокгольме Шестрандом в 1950-х гг. Название теста PWC170 представляет собой аббревиатуру от англ. Physical Working Capacity — выражения физическая работоспособность. ВОЗ этот тест обозначается W170. С помощью данного теста определяют мощность физической нагрузки, при которой ЧСС достигает уровня 170 уд./мин. Выбор именно этой ЧСС определён тем, что зона оптимального функционирования кардио-респираторной системы для лиц молодого возраста (до 30 лет) ограничивается диапазоном пульса от 170 до 200 уд./мин. Частота пульса 170 уд./мин, таким образом, характеризует оптимальный по производительности режим функционирования сердечно-сосудистой системы во время физических нагрузок. Взаимосвязь между ЧСС и мощностью выполняемой нагрузки имеет линейный характер в границах пульса 120–170 уд./мин, т. е. когда сохраняются аэробные механизмы энергообеспечения. При более высоких значениях ЧСС линейный характер этой взаимосвязи нарушается, поскольку на фоне развития утомления активизируются анаэробные (гликолитические) процессы энергоснабжения и обеспечения мышечной работы. При последующем увеличении нагрузки энергообеспечение осуществляется за счёт смешанных аэробно-анаэробных механизмов. Наличие линейной зависимости между мощностью работы и ЧСС в границах 120–170 уд./мин позволяет использовать нагрузки, которые не предусматривают по-

вышение пульса до 170 уд./мин. При этом определять величину PWC170 можно по показателям ЧСС после двух или трёх нагрузок меньшей интенсивности (при условии, что вторая нагрузка больше первой, третья соответственно больше второй) методом графической экстраполяции.

Точным считается расчёт данного показателя по формуле, которая предложена В.Л. Карпманом с соавт. (1974):

$$PWC_{170} = W_1 + (W_2 - W_1) \times \frac{170 - f_1}{f_2 - f_1}$$

где: PWC₁₇₀ — уровень физической работоспособности при ЧСС=170 уд./мин; W₁ и W₂ — мощность 1-й и 2-й нагрузок; f₁ и f₂ — ЧСС за 30 с в конце 1-й и 2-й нагрузок.

Следует отметить, что определение физической работоспособности с помощью теста PWC170 даёт надёжные результаты лишь в случае соблюдения определённых условий. Прежде всего, в отличие от спортивных нагрузок, пробу PWC170 следует выполнять без предыдущей разминки (разминка может привести к занижению результатов пробы) [3, 4, 7].

В практике спортивной медицины используются в основном два варианта теста PWC170 — велоэргометрический и степ-эргометрический. Наилучшим вариантом работы является велоэргометрическая нагрузка, которая позволяет сохранять определённую интенсивность работы (частота вращения педалей велоэргометра должна быть в диапазоне 60–70 об./мин) и вовлекать в деятельность большие группы мышц. Ни тот, ни другой не приемлем для наших животных, и мы остановили свой выбор на варианте с использованием беговой дорожки.

При проведении субмаксимального теста на движущейся дорожке для тестирования конкретного спортсмена выбирается опти-

мальный вариант повышения нагрузки в зависимости от пола обследуемого, от вида спорта и уровня спортивного мастерства. Особенностью теста является прекращение выполнения нагрузки по достижении обследуемым субмаксимальной ЧСС. По результатам проведённого теста, зная значения ЧСС на этапах нагрузки, легко рассчитывается физическая работоспособность (PWC170) по формуле Карпмана [4].



Рис. 1. Мини-свинья на беговой дорожке типа Pet Treadmill wikiRUN № 3.

Fig. 1. A mini-pig on a treadmill type Pet Treadmill wikiRUN No. 3.



Рис. 2. Мини-свинья с нагрудным датчиком измерения пульса Wahoo Tickr X.

Fig. 2. A mini-pig with a Wahoo Tickr X chest heart rate sensor.

Следует отметить, что результаты, получаемые на моделях бега животных с использованием тредбанов, хорошо экстраполируются на человека в силу высокой гомологичности механизмов, обеспечивающих бег у человека и животных. У тех и других длительность выполнения бега имеет гиперболическую зависимость от скорости. Такая зависимость определяется тем, что до достижения определённого значения скорости (такую скорость называют критической) бег может выполняться человеком и животными неограниченно долго. Энергетически такая нагрузка обеспечивается за счёт аденозинтрифосфата (АТФ), получающегося в основном в результате аэробного окисления глюкозы, у человека и животных в среднем не повышается до 4 ммоль/л, уровень потребления кислорода не превышает 79–80% от максимального потребления кислорода (VO_{2max}) [1, 8].

Материалы и методы

Мы попытались адаптировать и провести не прямой субмаксимальный нагрузочный тест PWC170 на светлогорских мини-свиньях, используя доступное нам оборудование: беговую дорожку и нагрудный датчик измерения пульса. Животные в возрасте 6 мес. живой массой 25–20 кг, обоих полов тестировались впервые. Для проведения теста мы использовали беговую дорожку для животных типа Pet Treadmill wikiRUN № 3 для собак малых и средних пород с защитной сеткой (Россия).

Для подсчёта ЧСС мы использовали аускультативный метод и нагрудный датчик измерения пульса Wahoo Tickr X, оснащённый технологиями Bluetooth и ANT+, который подключали к телефону (рис. 2). Датчик фиксировали на животном в области сердца с левой стороны с помощью регулируемого мягкого ремешка.

Сначала устанавливали связь с датчиком и давали животному немного успоко-

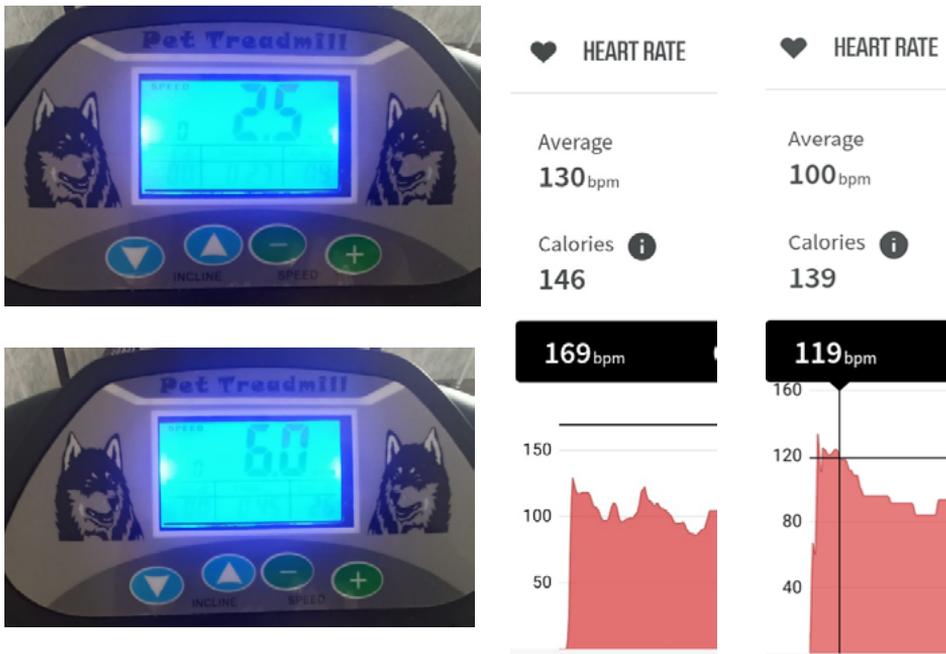


Рис. 3. Скорость при показателях ЧСС 120 и 170 уд./мин, км/ч.
Fig. 3. Speed at heart rate indicators of 120 and 170 bpm, km/h.

иться, потом ставили его на полотно беговой дорожки и запускали её со скоростью 2–3 км/ч. Фиксировали скорость движения при ЧСС 120 и скорость движения при ЧСС до 170 в протоколе теста (рис. 3).

Далее подставляли полученные результаты в формулу, приведённую ранее, и вычисляли физическую работоспособность PWC170.

Результаты и их обсуждение

Было протестировано 10 животных, у которых определили физическую работоспособность (табл.).

Таким образом, мы установили количественные различия по уровню физической работоспособности в группе одновозрастных животных, которые ранее не получали нагрузку на беговой дорожке. Данные показатели можно отнести к генетическому потенциалу, полученному от родителей. Известно, что данный показатель может

меняться под воздействием тренировочного процесса. Из данных таблицы видно, что хрячки имеют более высокий уровень работоспособности и могут быть использованы в исследованиях. Это позволит нам в дальнейшем распределять животных в группы по уровню физической работоспособности для проведения исследований и давать им адекватную физическую нагрузку без риска для здоровья.

Таблица. Физическая работоспособность светлогорских мини-свиней, км/ч.

Table. Physical performance of Svetlogorsk mini pigs, km/h.

№ п/п	Свинки	Хрячки
1	4,18	6,20
2	4,05	5,39
3	3,04	4,05
4	2,53	3,60
5	2,53	3,04

Выводы

Используемый тест является наименее трудозатратным для проведения в условиях нашей лаборатории и наиболее гуманным по отношению к животным, а показатель физической работоспособности легко рассчитывается по формуле. К недостаткам можно отнести неплотную фиксацию дат-

чика на теле мини-свиньи, т. к. он разработан для грудной клетки человека. Возникает потеря в связи с увеличением скорости движения, что приводит к вынужденному прекращению теста. Возможен подбор специализированного оборудования именно для животных типа многофункциональной холтеровской системы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Иванов Д.Г., Александровская Н.В. и др. Адаптационные изменения у крыс при ежедневном выполнении физической нагрузки в методике «Бег на тредбане». *Биомедицина*. 2017;2:4–22. [Ivanov D.G., Aleksandrovskaia N.V. Adaptatsionnye izmeneniya u krysv pri ezhednevnom vypolnenii fizicheskoy nagruzki v metodike «Beg na tredbane»]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2017;2:4–22. (In Russian).
2. Каркищенко В.Н., Капанадзе Г.Д., Деньгина С.Е., Станкова Н.В. Разработка методики оценки физической выносливости мелких лабораторных животных для изучения адаптационной активности некоторых лекарственных препаратов. *Биомедицина*. 2011;1:72–74. [Karkischenko V.N., Kapanadze G.D., Dengina S.E., Stankova N.V. Razrabotka metodiki otsenki fizicheskoy vynoslivosti melkikh laboratornykh zhivotnykh dlya izucheniya adaptogennoy aktivnosti nekotorykh lekarstvennykh preparatov]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2011;1:72–74. (In Russian).
3. Каркищенко Н.Н., Уйба В.В., Каркищенко В.Н., Шустов Е.Б. *Очерки спортивной фармакологии. Т. 1. Векторы экстраполяции*. Под ред. Н.Н. Каркищенко и В.В. Уйба. М., СПб.: Айсинг, 2013:288. [Karkischenko N.N., Ujba V.V., Karkischenko V.N., Shustov E.B. *Ocherki sportivnoy farmakologii. T. 1. Vektory ekstrapolyatsii [Essays on sports pharmacology. Vol. 1. Extrapolation vectors]*. Ed. by N.N. Karkischenko, V.V. Ujba. Moscow, Saint Petersburg: Ajsing Publ., 2013:288. (In Russian)].
4. Ландыр А.П., Ачкасов Е.Е., Медведев И.Б. *Тесты с дозируемой физической нагрузкой в спортивной медицине*. М.: Спорт, 2019:256. [Landyr' A.P., Achkasov E.E., Medvedev I.B. *Testy s doziruemyo fizicheskoy nagruzkoj v sportivnoy meditsine [Tests with dosed physical activity in sports medicine]*. Moscow: Sport Publ., 2019:256. (In Russian)].
5. Павлов С.Е., Кузнецова Т.Н. Адаптация и стресс в спорте. В сб.: *Актуальные вопросы медицинской реабилитации в современных условиях*. М., 1999:307–312. [Pavlov S.E., Kuznetsova T.N. Adaptatsiya i stress v sporte]. В сб.: *Aktual'nye voprosy meditsinskoy rehabilitatsii v sovremennykh usloviyakh [In the collection: Actual problems of medical rehabilitation in modern conditions]*. Moscow, 1999:307–312. (In Russian).
6. *Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях*. Под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. М.: Профиль-2С, 2010:358. [Rukovodstvo po laboratornym zhivotnym i alternativnym modelyam v biomeditsinskikh issledovaniyakh]. Ed. by N.N. Karkischenko, S.V. Grachev. Moscow: Profil-2S Publ., 2010:358. (In Russian)].
7. <https://medbe.ru/materials/sportivnaya-reabilitatsiya/otsenka-fizicheskoy-rabotosposobnosti-metody-i-testy/>
8. Janssen P.G.J.M. Lactate threshold training. *Human Kinetics*. 2001:303.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Станкова Наталия Владимировна*, к.б.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;

e-mail: snv@scbmt.ru

Савина Мария Анатольевна, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;

e-mail: graff22@mail.ru

Nataliia V. Stankova*, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: snv@scbmt.ru

Mariya A. Savina, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: graff22@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

<https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-95-98>



БИОМОДЕЛИРОВАНИЕ ЛЁГОЧНЫХ ПАТОЛОГИЙ ПОСРЕДСТВОМ ИНТРАТРАХЕАЛЬНОЙ ИНСТИЛЛЯЦИИ СЕНСИБИЛИЗИРУЮЩИХ ВЕЩЕСТВ ЛАБОРАТОРНЫМ ЖИВОТНЫМ

Л.А. Табоякова*, О.В. Алимкина, Н.С. Огнева, Е.С. Савченко

ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»
143442, Российская Федерация, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, 1

На мелких и крупных лабораторных животных изучена и оптимизирована под задачи НЦБМТ ФМБА России методика эндотрахеального введения. С помощью интратрахеальной инстилляцией сенсibiliзирующих веществ создана и апробирована в доклинических исследованиях биомодель коронавирусной пневмонии.

Ключевые слова: интратрахеальная инстилляцией, лёгкие, биомоделирование, доклинические исследования, лабораторные животные

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Табоякова Л.А., Алимкина О.В., Огнева Н.С., Савченко Е.С. Биомоделирование лёгочных патологий посредством интратрахеальной инстилляцией сенсibiliзирующих веществ лабораторным животным. *Биомедицина*. 2021;17(3E):95–98. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-95-98>

Поступила 22.03.2021

Принята после доработки 13.05.2021

Опубликована 20.10.2021

BIOMODELING OF PULMONARY PATHOLOGIES BY MEANS OF INTRATRACHEAL INSTILLATION OF SENSITIZING SUBSTANCES IN LABORATORY ANIMALS

Lidiya A. Taboyakova*, Oksana V. Alimkina, Nastasya S. Ogneva, Elena S. Savchenko

Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia
143442, Russian Federation, Moscow Region, Krasnogorsk District, Svetlye Gory Village, 1

A method for endotracheal administration was studied and optimized for the tasks of the Scientific Centre for Biomedical Technologies (SCBMT), Russia, on small and large laboratory animals. By means of intratracheal instillation of sensitizing substances, a biomodel of coronavirus pneumonia was created and tested in preclinical studies.

Keywords: intratracheal instillation, lungs, biomodelling, preclinical studies, laboratory animals

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Taboyakova L.A., Alimkina O.V., Ogneva N.S., Savchenko E.S. Biomodeling of Pulmonary Pathologies by Means of Intratracheal Instillation of Sensitizing Substances in Laboratory Animals. *Journal Biomed*. 2021;17(3E):95–98. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-95-98>

Submitted 22.03.2021

Revised 13.05.2021

Published 20.10.2021

Доклинические исследования фармакологических препаратов проводятся с введением тестируемых средств лабораторным животным разными путями — внутрижелудочно, внутрибрюшинно, внутримышечно, подкожно, внутривенно и т. д. Выбор способа введения прежде всего зависит от планируемого метода применения лекарственного средства в клинической практике [1–3].

Для введения препаратов в лёгкие применяется ингаляция и интратрахеальная инстилляционная. Ингаляция основана на вдыхании газообразных и летучих веществ, жидкостных аэрозолей и порошков определённого размера частиц естественным способом или искусственно, с применением специальных устройств-распылителей (ингаляторов).

Интратрахеальная инстилляционная предполагает введение вещества непосредственно в трахею животным (у людей — эндотрахеальное введение). Метод широко используется в т. ч. для проверки респираторной токсичности и по сравнению с ингаляцией позволяет лучше контролировать дозу и местонахождение вещества (без попадания в ЖКТ, на кожу, в общий кровоток), он экономически выгоднее, т. к. позволяет использовать меньшие количества веществ, не оказывает влияния на исследователей. К особенностям метода относятся нефизиологический характер (обходя верхние дыхательные пути), медленное выведение веществ [4].

В биомедицинских исследованиях интратрахеальная инстилляционная применяется для изучения фармакологической активности и безопасности исследуемого препарата, а также представляет особый интерес при моделировании патологии органов дыхательной системы. Наряду с инвазивным (инъекция непосредственно в трахею) возможен и неинвазивный способ инстилляционной, через глотку с помощью интратрахеального зонда. Введение проводится

под общим наркозом во избежание травмирования животных и требует от специалистов определённых знаний и технических навыков.

Наиболее простым и малоинвазивным способом является введение через ротоглотку зондом. Для проведения этой процедуры могут применяться металлические атравматические зонды для внутрижелудочного введения. После наркотизирования животного фиксируют в положении лёжа на спине, зонд вводят в ротовую полость, между голосовыми связками. С помощью небольшого надавливания на надгортанный хрящ проводят инструмент в просвет трахеи до уровня её бифуркации и осуществляют введение (рис. 1). При введении крысам можно ориентироваться на тактильные ощущения зонда в проекции трахеи. С мышами по причине слишком мелкого размера животных этот критерий контроля правильности попадания затруднителен. Для проверки расположения инструмента в респираторном, а не в желудочно-кишечном тракте применяется аккуратное введение воздуха шприцем в эндотрахеальный зонд. Если инструмент находится в респираторном тракте, наблюдают подъём грудной клетки, подтверждающий наполнение лёгких воздухом. Улучшить визуализацию надгортанника и точность попадания в трахею возможно с применением эндоскопа.

При использовании иглы прокол осуществляется в среднюю треть шеи или область трахеи ближе к грудной стенке (рис. 2). Шёрстный покров в месте введения иглы в трахею выбривается, место инъекции дезинфицируется, разводятся края раны и слюнная железа, игла устанавливается между кольцами трахеи и осуществляется введение необходимого количества препарата, затем проводится ушивание раны.

Интратрахеальная инстилляционная веществ мини-свиньям осуществляется методом интубации (рис. 3). Животное вводит-

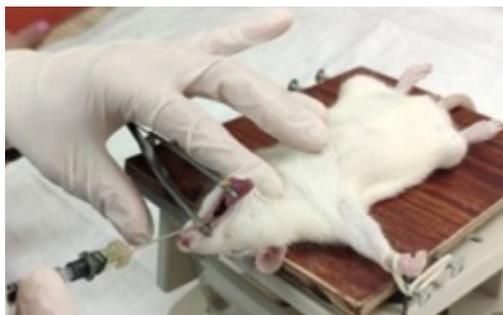


Рис. 1. Интратрахеальная инстилляцией вещества крысам с помощью зонда.

Fig. 1. Intratracheal instillation of a substance into rats using a probe.



Рис. 2. Интратрахеальная инстилляцией вещества мышам с помощью иглы.

Fig. 2. Intratracheal instillation of a substance into mice using a needle.

ся в глубокий наркоз, чтобы снять кашлевой рефлекс, укладывается в грудном положении и фиксируется, исключая перемещения с боку на бок. Рот широко раскрывается и при сильно вытянутом языке визуализируется хрящевой надгортанник. С помощью ларингоскопического клинка в просвет гортани вводится интубационная трубка, максимально по нижней стенке гортани.

В исследованиях, проведённых сотрудниками НЦБМТ ФМБА России, апробирована методика интратрахеальной инстилляцией препаратов мелким и крупным лабораторным животным. В частности, установлено, что допустимый объём вводимого вещества мышам составляет 0,02–0,06 мл, крысам — 0,25–0,6 мл, мини-свиньям — 0–1 мл/кг живого веса.

На мышах инбредных линий (C57BL/6Y, CBA/лас, BALB/c и др.), крысах Вистар и мини-свиньях светлогорской популяции с помощью процедур интратрахеальной инстилляцией α -галактозилцерамида, бактериального липополисахарида и сенсibiliзирующих агентов создана биологическая модель лёгочной патологии, характеризующаяся диффузным альвеолярным поражением, пневмонией и высокой летальностью, что позволило воспроизвести существенные признаки острого респираторного дистресс-синдрома и «цито-



Рис. 3. Интратрахеальная инстилляцией вещества мини-свиньям методом интубации.

Fig. 3. Intratracheal instillation of a substance into mini pigs by intubation.

кинового шторма», возникающие в т. ч. при вирусных инфекциях. С применением данной биомодели проведены доклинические исследования инновационных лекарственных средств, эффективных в борьбе с COVID-19.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Каркищенко Н.Н. *Основы биомоделирования*. М.: Межкадаемическое изд-во ВПК, 2004:607. [Karkischenko N.N. *Osnovy biomodelirovaniya [Basics of biomodeling]*. Moscow: Mezhkademicheskoye Izdatel'stvo VPK, 2007:320. (In Russian)].
2. Макаренко И.Е., Авдеева О.И., Ванатиев Г.В., Рыбакова А.В., Ходько С.В., Макарова М.Н., Макаров В.Г. Возможные пути и объёмы введения лекарственных средств лабораторным животным. *Международный вестник ветеринарии*. 2013;3:78–83. [Makarenko I.E., Avdeeva O.I., Vanatiev G.V., Rybakova A.V., Khodko S.V., Makarova M.N., Makarov V.G. Vozmozhnye puti i ob'emny vvedeniya lekarstvennykh sredstv laboratornym zhitvotnym [Possible routes and volumes of drug administration to laboratory animals]. *Mezhdunarodnyy vestnik veterinarii [International Veterinary Bulletin]*. 2013;3:78–83. (In Russian)].
3. *Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях*. Под ред. Н.Н. Каркищенко и др. М.: Профиль-2С, 2010:358. [*Rukovodstvo po laboratornym zhitvotnym i alternativnym modelyam v biomeditsinskikh issledovaniyakh [Manual on laboratory animals and alternative models in biomedical research]*. Ed. by N.N. Karkischenko, et al. Moscow: Profil'-2S Publ., 2010:358. (In Russian)].
4. Трофимец Е.И., Макарова М.Н., Кательникова А.Е., Крышень К.Л. Эндотрахеальный способ введения лекарственных средств лабораторным животным. *Лабораторные животные для научных исследований*. 2020;2:65–75. [Trofimits E.I., Makarova M.N., Katel'nikova A.E., Kryshen' K.L. Endotraheal'nyj sposob vvedeniya lekarstvennykh sredstv laboratornym zhitvotnym [Endotracheal drug administration to laboratory animals]. *Laboratornye zhitvotnye dlya nauchnykh issledovaniy [Laboratory Animals for Science]*. 2020;2:65–75. (In Russian)]. DOI: 10.29296/2618723X-2020-02-08.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Табоякова Лидия Александровна*, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;

e-mail: lida-vet@mail.ru

Алимкина Оксана Владимировна, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;

e-mail: alimkina@scbmt.ru

Огнева Настасья Сергеевна, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;

e-mail: ognevanastya@mail.ru

Савченко Елена Сергеевна, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;

e-mail: savelaine@gmail.com

Lidiya A. Taboyakova*, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: lida-vet@mail.ru

Oksana V. Alimkina, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: alimkina@scbmt.ru

Nastasya S. Ogneva, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: ognevanastya@mail.ru

Elena S. Savchenko, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: savelaine@gmail.com

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

НАПРАВЛЕННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ МИКРОБИОМА ЧЕЛОВЕКА: ВКЛАД В РЕШЕНИЕ ДЕМОГРАФИЧЕСКОЙ ПРОБЛЕМЫ В РОССИИ

**В.М. Абрамов¹, И.В. Косарев¹, Т.В. Припутневич², В.С. Хлебников¹, Р.Н. Василенко¹,
С.Ю. Пчелинцев¹, В.Н. Каркищенко³, А.В. Мачулин^{4*}, Т.Н. Абашина⁴, В.А. Самойленко⁴,
М.Т. Гасанов³, В.Н. Уверский⁵, А.В. Карлышев⁶**

¹ ОАО «Институт инженерной иммунологии»
142380, Российская Федерация, Московская обл., Чеховский р-н, п. Любучаны, ул. Научная, 1

² ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства,
гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова» Минздрава России
117997, Российская Федерация, Москва, ул. Академика Опарина, 4

³ ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»
143442, Российская Федерация, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, 1

⁴ ФГБУН «Федеральный исследовательский центр
«Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»
142290, Российская Федерация, Московская обл., г. Пушкино, просп. Науки, 3

⁵ Университет Южной Флориды
33620, США, Флорида, Тампа, просп. Е. Фаулер, 4202

⁶ Кингстонский университет
KT1 1LQ, Великобритания, Лондон, Суррей, Кингстон-апон-Темс,
ул. Хайстрит, 53-57, Ривер Хаус

Для решения возникшей в России демографической проблемы требуются комплексные многосторонние подходы, направленные на повышение рождаемости и снижение детской и взрослой смертности. Одним из подходов для решения этой проблемы является направленная регуляция микробиома человека.

Ключевые слова: демографическая проблема, направленная регуляция микробиома

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Абрамов В.М., Косарев И.В., Припутневич Т.В., Хлебников В.С., Василенко Р.Н., Пчелинцев С.Ю., Каркищенко В.Н., Мачулин А.В., Абашина Т.Н., Самойленко В.А., Гасанов М.Т., Уверский В.Н., Карлышев А.В. Направленная регуляция микробиома человека: вклад в решение демографической проблемы в России. *Биомедицина*. 2021;17(3E):99–105. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-99-105>

Поступила 08.04.2021

Принята после доработки 23.07.2021

Опубликована 20.10.2021

DIRECTED REGULATION OF THE HUMAN MICROBIOME: CONTRIBUTION TO THE SOLUTION OF THE DEMOGRAPHIC PROBLEM IN RUSSIA

**Vyacheslav M. Abramov¹, Igor V. Kosarev¹, Tatiana V. Pripitnevich²,
Valentin S. Khlebnikov¹, Raisa N. Vasilenko¹, Sergey Yu. Pchelintsev¹,
Vladislav N. Karkischenko³, Andrey V. Machulin^{4*}, Tatiana N. Abashina⁴,
Vladimir A. Samoilenko⁴, Melik T. Gasanov³, Vladimir N. Uversky⁵, Andrey V. Karlyshev⁶**

¹ Institute of Immunological Engineering
142380, Russian Federation, Moscow Region, Chekhov District, Lyubuchany, Nauchnaya Str., 1

² National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology
named after Academician V.I. Kulakov of the Ministry of Health Care of Russia
117997, Russian Federation, Moscow, Akademika Oparina Str., 4

³ Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia
143442, Russian Federation, Moscow Region, Krasnogorsk District, Svetlye Gory Village, 1

⁴ Federal Research Center "Pushchino Scientific Center for Biological Research
of the Russian Academy of Sciences"
142290, Russian Federation, Moscow Region, Pushchino, Science Avenue, 3

⁵ University of South Florida
33620, USA, Florida, Tampa, 4202 E. Fowler Avenue

⁶ Kingston University London
KT1 1LQ, Great Britain, London, Surrey, Kingston upon Thames, 53-57 High Str., River House

In order to solve the demographic problem that has arisen in Russia, comprehensive multilateral approaches are required, aimed at increasing the birth rate and reducing child and adult mortality. One approach to solve this problem is directed regulation of the human microbiome.

Keywords: demographic problem, directed regulation of the microbiome

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Abramov V.M., Kosarev I.V., Pripitnevich T.V., Khlebnikov V.S., Vasilenko R.N., Pchelintsev S.Yu., Karkischenko V.N., Machulin A.V., Abashina T.N., Samoilenko V.A., Gasanov M.T., Uversky V.N., Karlyshev A.V. Directed Regulation of the Human Microbiome: Contribution to the Solution of the Demographic Problem in Russia. *Journal Biomed.* 2021;17(3E):99–105. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-99-105>

Submitted 08.04.2021

Revised 23.07.2021

Published 20.10.2021

В настоящее время динамика показателей рождаемости и смертности в России приобрела угрожающий характер. Согласно статистическим данным, в 2019 г. умерло на 200 тыс. чел. больше, чем родилось. Это обусловлено увеличением частоты как детской, так и взрослой смертности.

Высокая детская смертность наблюдается в возрасте до 5 лет. Это тесно связано с преждевременными родами.

Так, в 2019 г. родились преждевременно 110 тыс. детей. Причиной преждевременных родов в 90% случаев является вагинальный дисбиоз у беременной женщины, ведущий к развитию урогенитальных инфекционных заболеваний, нарушающих нормальное внутриутробное развитие ребёнка.

Преждевременно рождённые — это дети с недоразвитыми функциональными си-

стемами организма (пищеварительной, иммунной, нервной и др.). У таких детей часто развивается некротизирующий энтероколит (НЭК), переходящий в сепсис с летальным исходом. После хирургического лечения НЭК смертность составляет 50%. НЭК у новорождённого возникает в результате формирования кишечного дисбиоза. В кишечной микробиоте таких детей обнаружено увеличенное содержание бактерий филума *Proteobacteria*, продуцирующих повышенное количество липополисахарида (ЛПС), отсутствие бактерий филума *Actinobacteria* и нарушение эпителиального барьера кишечника. Прослеживается взаимосвязь трагических событий:

- вагинальный дисбиоз у матери во время беременности;
- преждевременные роды;
- предрасположенность у новорождённого к развитию НЭК;
- высокая детская смертность в возрасте до 5 лет.

Экспоненциальный рост смертности населения России отмечается и в возрасте после 40 лет. Через каждые 8 лет вероятность смерти удваивается. Это связано со старением организма. Подобная закономерность отмечается и в других развитых странах мира. ВОЗ включила в Международную классификацию болезней (МКБ-11) заболевание, ассоциированное со старением, — «ageing related». Согласно данным ВОЗ, 70% всех смертей на земле являются возраст-зависимыми. ВОЗ официально признала: первичная и глубинная причина тяжёлых возрастных болезней, из-за которых умирает большинство людей, — старение организма. Это означает: устраняя причину (дряхление организма), можно избавиться от последствий — тех самых смертельно опасных болезней.

Наступившая эра микробиома открыла уникальные возможности для разработки прорывных технологий для профилактики НЭК у новорождённых, а также для сни-

жения скорости старения и смертности взрослого населения. Микробиом представляет собой совокупность обитающих в организме человека микроорганизмов. Он относится к функциональным системам организма подобно иммунной, пищеварительной, нервной и др. Основным биотопом микробиома организма человека является кишечная микробиота [3]. В 1 г содержимого слепой кишки обнаруживают около 2×10^9 микробных клеток (более 500 видов). В общей сложности в кишечнике насчитывается более 1000 различных видов микроорганизмов. После рождения ребёнка кишечная микробиота контролирует процесс созревания и нормальную работу врождённого иммунитета. Между кишечной микробиотой и хозяином существует метаболическая взаимосвязь. Она имеет решающее значение для поддержания жизненно важных функций, обеспечивающих здоровье хозяина. Здоровая кишечная микробиота укрепляет эпителиальный кишечный барьер. Однако с возрастом у человека развивается кишечный дисбиоз, связанный с постепенным увеличением в кишечной микробиоте бактерий филума *Proteobacteria*, продуцирующих повышенное количество ЛПС, и уменьшением бактерий филума *Actinobacteria*. Снижение в кишечной микробиоте филума сахаролитических бактерий (лактоациллы, бифидобактерии) уменьшает выработку короткоцепочечных жирных кислот (КЦЖК), обеспечивающих 20% ежедневной энергетической потребности организма. КЦЖК обеспечивают трофику энтероцитов и участвуют в репаративных процессах кишечника. Они стимулируют пролиферацию кишечных стволовых клеток и их дифференцировку в зрелые энтероциты. Патологические изменения в составе кишечной микробиоты повреждают нормальный метаболизм и гомеостатические взаимодействия «микробиота — хо-

зьян», а также нарушают эпителиальный барьер кишечника. Дисфункция эпителиального кишечного барьера ведёт к неконтролируемой транслокации из кишечника ЛПС, который является агонистом TLR4-рецепторов врождённого иммунитета, экспрессируемых на поверхности эндотелия сосудов, капилляров, а также на различных иммунокомпетентных клетках организма. ЛПС активирует врождённый иммунитет. Клетки врождённого иммунитета начинают секретировать бактерицидные факторы и провоспалительные цитокины, вызывающие в организме воспаление. В норме через 24 ч клетки врождённого иммунитета переключаются по принципу обратной связи на продукцию противовоспалительных цитокинов и воспаление прекращается. При возрастном кишечном дисбиозе в связи с длительной дисфункцией кишечного барьера неконтролируемая длительная транслокация ЛПС постоянно активирует врождённый иммунитет, который формирует в организме хроническое низкоинтенсивное воспаление, инициирующее «воспалительное старение» [5].

Длительные дисбиотические нарушения метаболизма у взрослых ведут к развитию метаболического синдрома (МС) — одной из основных причин преждевременного старения [4]. Патогенетическими звеньями МС являются: сахарный диабет второго типа (СД2), ожирение, инсулинорезистентность, нейродегенеративные процессы, катаракта, сердечно-сосудистые заболевания (артериальная гипертензия, инсульт, инфаркт). В экспериментах на мышах показано, что инфузия ЛПС мышам с нормальной массой тела индуцирует развитие МС (ожирение, инсулинорезистентность, развитие СД2). В клинических исследованиях у лиц с ожирением также отмечается более высокая концентрация ЛПС в крови. Проведённые

в России исследования выявили наличие МС у 29,7% (каждый третий!) взрослого населения [2]. Распространение МС среди населения всего мира приняло характер пандемии, которая послужила патофизиологической основой для развития пандемии COVID-19 [9]. Первостепенная задача в борьбе с коронавирусной пандемией — вакцинация населения и контроль за развитием популяционного иммунитета. Не менее важной задачей является профилактика МС.

В зарубежной и отечественной литературе накапливаются экспериментальные и клинические данные, свидетельствующие о перспективности включения про-, пре-, мета- и геробиотиков, направленно регулирующих кишечную микробиоту, в схемы персонализированного лечения пациентов, страдающих патологиями, характерными для симптомокомплекса МС [1, 7, 8]. Укорочение теломера — один из основных аспектов старения. Применение геробиотиков (*Lactobacillus fermentum* DR9; *L. reuteri* 8513D) предотвращало укорочение теломера у стареющих крыс, использованных в качестве биомодели «воспалительного старения» [8].

В настоящее время в мире проводятся интенсивные исследования по разработке методов коррекции кишечной и вагинальной микробиоты с помощью про-, пре- и метабиотиков. В России нами разрабатывается линейка инновационных пробиотических лекарственных средств (ЛС) для профилактики и комплексного лечения урогенитальных инфекций у женщин репродуктивного возраста (Вагинормин), профилактики и комплексного лечения лактационного мастита у кормящих грудью матерей (Лактомастин), профилактики некротизирующего энтероколита у новорождённых (АнтиНЭК). Исследования выполняются консорциумом научных организаций (ОАО «Институт инженерной иммунологии»; ФГБУН «Научный

центр биомедицинских технологий ФМБА России»; ФГБУН ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований» РАН). Консорциум возглавляет ФГБУ «НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова» Минздрава России.

Завершены доклинические испытания разрабатываемого ЛС «Вагинормин». Установлено, что Вагинормин обладает выраженной антагонистической активностью к уропатогенам, а также к патогенам, индуцирующим бактериальный вагиноз и аэробный вагинит. Доклинические испытания проходят Лактомастин и АнтиНЭК. Показано, что Лактомастин оказывает бактерицидное действие на основной мастит-индуцирующий патоген — *Staphylococcus aureus*, АнтиНЭК ингибирует рост энтероколит-индуцирующих бактерий филума *Proteobacteria*. Применение инновационных пробиотических препаратов для восстановления вагинальной микробиоты у женщин репродуктивного возраста и препаратов для профилактики НЭК у новорождённых позволит снизить число преждевременных родов и показатели смертности детей в возрасте 0–5 лет.

Разработка методов персонализированной комплексной направленной регуляции микробиома позволит в ближайшие 10–20 лет существенно замедлить процессы старения организма и обеспечить человеку активное профессиональное долголетие.

Заключение

Высокая детская смертность в возрасте до 5 лет в основном связана с наличием у матери урогенитальных инфекционных заболеваний в период беременности. Урогенитальные инфекции — угроза нормальному протеканию беременности (преждевременные роды, внутриутробное инфицирование плода, самопроизвольный выкидыш). Снижение эффективности антибиотикотерапии диктует необходимость создания инновационных пробиотических препаратов для восстановления нормальной микробиоты репродуктивной системы женщины, поддержания её здоровья и снижения детской смертности.

Пандемия метаболического синдрома заставляет искать новые подходы в профилактике и лечении заболеваний (сахарный диабет второго типа, ожирение, инфаркт, инсульт и др.), характерных для этого симптомокомплекса. Кишечная микробиота служит потенциальной мишенью для влияния на процессы атерогенеза, ожирения, инсулинорезистентности. Доказано, что нарушенный состав кишечной микробиоты повышает риск развития сердечно-сосудистых и др. заболеваний, связанных с хронической активацией врождённого иммунитета, что приводит к преждевременной смертности. Многообещающие результаты научных исследований указывают на преимущества включения в схемы лечения пациентов с метаболическим синдромом препаратов, влияющих на кишечную микробиоту.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Ардатовская М.Д. *Масляная кислота и инулин в клинической практике: теоретические аспекты и возможности клинического применения*. М.: Форте принт, 2014:64. [Ardatskaya M.D. *Maslyanaya kislota i inulin v klinicheskoy praktike: teoreticheskie aspekty i vozmozhnosti klinicheskogo primeneniya* [Butyric acid and inulin in clinical practice: theoretical aspects and possibilities of clinical use]. Moscow: Forte print Publ., 2014:64. (In Russian)].
2. Бойцов С., Баланова Ю.А., Шальнова С.А. и др. Артериальная гипертония среди лиц 25–64 лет: распространённость, осведомлённость, лечение и контроль. По материалам исследования ЭССЕ. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2014;13(4):4–14. [Boytsov S.A., Balanova Yu.A., Shalnova S.A., et al. Arterial'naja gipertonija sredi lic 25–64 let: rasprostranjonnost', osvedomljonnost', lechenie i kontrol'. Po materi-

- alam issledovaniya ESSE [Arterial hypertension among individuals of 25–64 years old: prevalence, awareness, treatment and control. By the data from ECCD]. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika [Cardiovascular Therapy and Prevention]*. 2014;13(4):4–14. (In Russian)]. DOI: 10.15829/1728-8800-2014-4-4-142.
3. Arumugam M., Raes J., Pelletier E., et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*. 2011;473(7346):174–180. DOI: 10.1038/nature09944.
 4. Cani P., Delzenne N. The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease. *Curr. Pharm. Des.* 2009;15(13):1546–1558. DOI: 10.2174/138161209788168164.
 5. Franceschi C., Garagnani P., Vitale G., Capri M., Salvio S. Inflammaging and ‘Garb-aging’. *Trends Endocrinol. Metab.* 2017;28(3):199–212. DOI: 10.1016/j.tem.2016.09.005.
 6. Kim J., Jun J.M., Kim M.K., Kwon O., Cho B. Lactobacillus gasseri BNR17 supplementation reduces the visceral fat accumulation and waist circumference in obese adults: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J. Med. Food.* 2018;21(5):454–461. DOI: 10.1089/jmf.2017.3937.
 7. Lee S., Bose S., Seo J., et al. The effects of co-administration of probiotics with herbal medicine on obesity, metabolic endotoxemia and dysbiosis: A randomized double-blind controlled clinical trial. *Clin. Nutr.* 2014;33(6):973–981. DOI: 10.1016/j.clnu.2013.12.006.
 8. Lew S., Hor Y., Jaafar M., et al. Lactobacilli modulated AMPK activity and prevented telomere shortening in ageing rats. *Benef. Microbes.* 2019;10(8):883–892. DOI: 10.3920/BM2019.0058.
 9. Ritter A., Kreis N., Louwen F., Yuan J. Obesity and COVID-19: Molecular linking both pandemics. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(16):5793. DOI: 10.3390/ijms21165793.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Абрамов Вячеслав Михайлович, д.б.н., проф.,
ОАО «Институт инженерной иммунологии»;

e-mail: slavab2017@mail.ru

Косарев Игорь Васильевич, к.б.н., ОАО
«Институт инженерной иммунологии»;

e-mail: kosarev-52@mail.ru

Припутневич Татьяна Валерьевна, д.м.н.,
проф., ФГБУ «Национальный медицинский ис-
следовательский центр акушерства, гинекологии
и перинатологии им. В.И. Кулакова» Минздрава
России;

e-mail: priput1@gmail.com

Хлебников Валентин Сергеевич, д.б.н., проф.,
ОАО «Институт инженерной иммунологии»;

e-mail: vkhlebl@mail.ru

Василенко Раиса Николаевна, к.б.н., ОАО
«Институт инженерной иммунологии»;

e-mail: slavab2017@mail.ru

Пчелинцев Сергей Юрьевич, д.м.н., проф.,
ОАО «Институт инженерной иммунологии»;

e-mail: serg.pch@yandex.ru

Каркищенко Владислав Николаевич, д.м.н.,
проф., ФГБУН «Научный центр биомедицин-
ских технологий ФМБА России»;

e-mail: scbmt@yandex.ru

Мачулин Андрей Валериевич*, к.б.н., ФГБУН
«Федеральный исследовательский центр
«Пушкинский научный центр биологических
исследований РАН»;

e-mail: and.machul@gmail.com

Vyacheslav M. Abramov, Dr. Sci. (Biol.), Prof.,
Institute of Immunological Engineering;

e-mail: slavab2017@mail.ru

Igor V. Kosarev, Cand. Sci. (Biol.), Institute
of Immunological Engineering;

e-mail: kosarev-52@mail.ru

Tatiana V. Priputnevich, Dr. Sci. (Med.), Prof.,
National Medical Research Center for Obstetrics,
Gynecology and Perinatology named after
Academician V.I. Kulakov of the Ministry of Health
Care of Russia;

e-mail: priput1@gmail.com

Valentin S. Khlebnikov, Dr. Sci. (Biol.), Prof.,
Institute of Immunological Engineering;

e-mail: vkhlebl@mail.ru

Raisa N. Vasilenko, Cand. Sci. (Biol.), Institute
of Immunological Engineering;

e-mail: slavab2017@mail.ru

Sergey Yu. Pchelintsev, Dr. Sci. (Med.), Prof.,
Institute of Immunological Engineering;

e-mail: serg.pch@yandex.ru

Vladislav N. Karkischenko, Dr. Sci. (Med.),
Prof., Scientific Center of Biomedical Technologies
of the Federal Medical and Biological Agency
of Russia;

e-mail: scbmt@yandex.ru

Andrey V. Machulin*, Cand. Sci. (Biol.), Federal
Research Center “Pushchino Scientific Center
for Biological Research of the Russian Academy
of Sciences”;

e-mail: and.machul@gmail.com

Абашина Татьяна Николаевна, к.б.н., ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»;

e-mail: tnabashina@gmail.com

Самойленко Владимир Александрович, к.б.н., ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»;

e-mail: samva@rambler.ru

Гасанов Мелик Тофикович, к.м.н., доц., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;

e-mail: m.gasanov@scbmt.ru

Уверский Владимир Николаевич, д.ф.-м.н., проф., Университет Южной Флориды;

e-mail: vuversky@usf.edu

Карлышев Андрей Владимирович, к.б.н., проф., Кингстонский университет в Лондоне;

e-mail: a.karlyshev@kingston.ac.uk

Tatiana N. Abashina, Cand. Sci. (Biol.), Federal Research Center “Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences”;

e-mail: tnabashina@gmail.com

Vladimir A. Samoilenko, Cand. Sci. (Biol.), Federal Research Center “Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences”;

e-mail: samva@rambler.ru

Melik T. Gasanov, Cand. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: m.gasanov@scbmt.ru

Vladimir N. Uversky, Dr. Sci. (Phys.-Math.), Prof., University of South Florida;

e-mail: vuversky@usf.edu

Andrey V. Karlyshev, Cand. Sci. (Biol.), Prof., Kingston University London;

e-mail: a.karlyshev@kingston.ac.uk

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author



ИДЕНТИФИКАЦИЯ КОМПОНЕНТНОГО СОСТАВА ЖЕНЬШЕНЯ, КУЛЬТИВИРУЕМОГО В РЕСПУБЛИКЕ АЛТАЙ

А.И. Левашова*, Д.В. Хвостов, Р.А. Агельдинов, М.С. Нестеров

ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»
143442, Российская Федерация, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, 1

Женьшень — растение, применяемое в фитомедицине во всём мире, поскольку обладает широким спектром биологической активности, в первую очередь за счёт высокого содержания сапонинов (гинсенозидов). В настоящее время в Республике Алтай возрождается лекарственное растениеводство, в т. ч. культивирование женьшеня. Для производства фитопрепаратов требуется оценка качества сырья. На данный момент в литературе нет сведений о гинсенозидном составе и лечебных свойствах женьшеня, выращиваемого в Республике Алтай.

В данной работе впервые представлен анализ экстрактов корней женьшеня Алтая методом ВЭЖХ-времяпролётной масс-спектрометрии: определен профиль основных биологически активных веществ — гинсенозидов, проведено сравнение с профилем сапонинов китайского аналога. Обнаружено, что «алтайский» женьшень содержит 17 гинсенозидов, 12 из которых рекомендованы к определению институтом стандартов США (NIST), причём 7 основных гинсенозидов (Rb1, Rc, Re, Rb2, Rg1, Rg и Rd) присутствуют в концентрациях 680–5375 мкг/г сырья. Гинсенозидные профили женьшеня, произрастающего на Алтае, и китайского образца сходны по качественному и количественному составу.

Установлено, что в корнях женьшеня содержится богатый состав гинсенозидов, присутствующих в высоких концентрациях. Следовательно, данное сырьё обладает значительным потенциалом для изготовления экстрактов и лекарственных средств на их основе для дальнейшего их применения в фитопрепаратах превентивной медицины РФ и для экспорта в другие страны.

Ключевые слова: женьшень Алтая, гинсенозиды, ВЭЖХ-МС, экстракция

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Левашова А.И., Хвостов Д.В., Агельдинов Р.А., Нестеров М.С. Идентификация компонентного состава женьшеня, культивируемого в Республике Алтай. *Биомедицина*. 2021;17(3E):106–113. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-106-113>

Поступила 24.05.2021

Принята после доработки 03.08.2021

Опубликована 20.10.2021

COMPOSITIONAL ANALYSIS OF GINSENG CULTIVATED IN THE ALTAI REPUBLIC

Anna I. Levashova*, Daniil V. Khvostov, Ruslan A. Ageldinov, Maxim S. Nesterov

Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia
143442, Russian Federation, Moscow Region, Krasnogorsk District, Svetlye Gory Village, 1

Ginseng a plant widely used in phytomedicine due to its pronounced biological activity, primarily connected with the high content of saponins (ginsenosides). The cultivation of ginseng in the Altai Republic is currently being resumed. The production of phytopreparations requires an assessment of the quality of raw plants. There is a lack of information on the composition and medicinal properties of ginseng grown in the Altai Republic.

In this research, for the first time, an analysis of Altai Ginseng roots was carried out by HPLC-QOT MS. The profile of the main biologically active substances — ginsenosides — was determined and compared with that of the Chinese analogue. We found that Altai ginseng contains 17 ginsenosides, 12 of which are recommended for the detection by NIST. The content of 7 main ginsenosides (Rb1, Rc, Re, Rb2, Rg1, Rg, Rd) ranges from 680 to 5,375 µg/g of raw material. The ginsenoside profiles of ginseng plants grown in Altai and China were found to be similar.

It is shown that ginseng roots contain a rich composition of ginsenosides, which are present in high concentrations. Consequently, this raw material has a significant potential for the manufacture of extracts for their further use in phytopreparations for preventive medicine in Russia and other countries.

Keywords: Altai ginseng, ginsenosides, HPLC-MS, extraction

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Levashova A.I., Khvostov D.V., Ageldinov R.A., Nesterov M.S. Compositional Analysis of Ginseng Cultivated in the Altai Republic. *Journal Biomed.* 2021;17(3E):106–113. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-106-113>

Submitted 24.05.2021

Revised 03.08.2021

Published 20.10.2021

Введение

В России и во всём мире ежегодно увеличивается потребление лекарств, фитопрепаратов, БАД, природной косметики на основе растений и, соответственно, растёт потребность в получении сырья для их изготовления. Создан специальный проект по возрождению отрасли лекарственного растениеводства [1], который является частью дорожной карты «Хелснет» Национальной технологической инициативы, который призван обеспечить растущие потребности российских фармпроизводителей в сырье — экстрактах из лекарственных растений, а также наладить экспорт препаратов и субстанций из лекарственных трав. В рамках этого проекта идут совместные исследования с участием учёных из Китайской Народной Республики, создаются агропарки, фермерские хозяйства.

Пилотным регионом проекта стала Республика Алтай, т. к. она занимает первое место в РФ по площади сельхозугодий и показал себя перспективным центром возрождения лекарственного растениеводства и переработки растительного сырья в России. Так, годовые эксперименты по культивированию 16 видов

лекарственных растений на нескольких площадках Республики Алтай показали достаточно высокую продуктивность, причём по некоторым растениям данный показатель был даже выше, чем ожидаемый специалистами.

Одним из растений, которое необходимо выращивать в больших масштабах, является женьшень, т. к. его используют в фитомедицине во всём мире. Женьшень содержит большой набор биологически-активных веществ (БАВ), которые обладают широким спектром биологической активности. Основным классом БАВ женьшеня являются тритерпеновые гликозиды (гинсенозиды). Экспериментальные исследования показали, что гинсенозиды проявляют различную биологическую активность, включая иммуномодулирующие и кардиотонические эффекты, оказывают противовоспалительное действие, способствуют снижению веса, стимулируют синтез белков крови и др. эффекты [5]. Медицинская практика показала, что препараты из женьшеня благотворно влияют на сердечно-сосудистую, иммунную, нервную системы, на заболевания почек, заболевания репродуктивной системы.

В настоящее время состав женьшеня, культивируемого в Республике Алтай, в частности, его гинсенозидный профиль, другие БАВ — не исследованы. В связи с этим **целью** данной работы стала идентификация гинсенозидного состава корней «алтайского» женьшеня, как наиболее фармацевтически ценной части растения, и сравнение с китайским аналогом [2]. Это позволит оценить его лекарственный потенциал для дальнейшего применения.

Материалы и методы

Приготовление экстрактов

0,1 г высушенных и измельчённых корней женьшеня помещали в стеклянную виалу с закручивающейся крышкой вместимостью 2 мл, добавляли 1,0 мл метанола (соотношение сырья/растворитель — 1/10), тщательно перемешивали. Затем виалы термостатировали при 50°C в течение 20–24 ч. Отбирали 200 мкл р-ра, центрифугировали при 12 000 об./мин в течение 10 мин. Полученный супернатант анализировали методом ВЭЖХ-МС.

Условия ВЭЖХ-МС

Систему Agilent 1290 Infinity ВЭЖХ использовали для прямого ввода образцов (5 мкл) в аналитическую колонку с обращённой фазой Agilent Poroshell C18 (150 мм×2,1 мм, размер — 2,7 мкм), температура колонки — 40°C. Элюирование осуществляли смесью, состоящей из фаз А и В, в градиентном режиме: 0–2,0 мин — 1% В; 2,01–15,0 мин увеличивается до 60% В и удерживается в течение 5 мин; 20,01–22,01 — 90% В, 22,02 мин — возвращение в исходные условия. Время уравнивания колонки на исходных условиях — 7 мин. Фаза А — деионизированная вода, содержащая 0,1% р-р уксусной кислоты. Фаза В — ацетонитрил, содержащий 0,1% р-р уксусной кислоты. Скорость потока — 350 мкл/мин, время анализа — 29 мин. Детекцию проводили в режиме Auto MS/MS на Agilent QTOF 6545XT LC/MS, с контролируемым программным обеспечением. Анализ полученных данных проводили с помощью MassHunter Workstation Agilent (версия В.08.01).

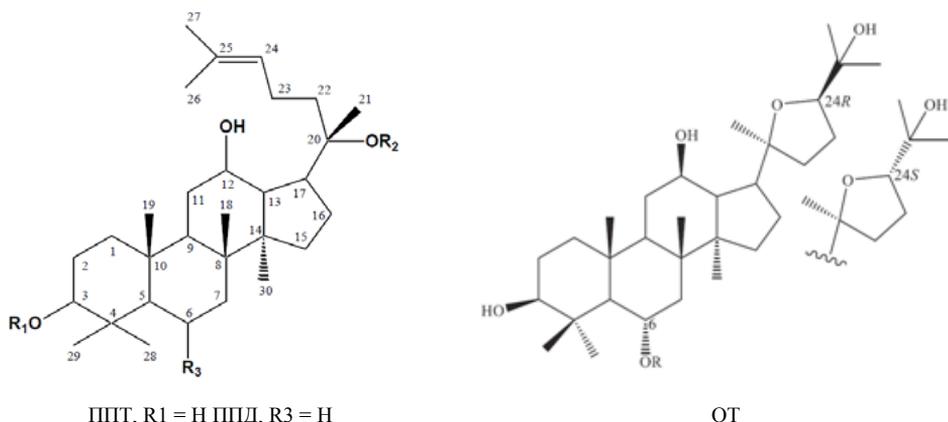


Рис. 1. Основные группы гинсенозидов женьшеня: протопанаксадиолы (ППД, R3=H), протопанаксатриолы (ППТ, R1=H) и октиллольные (ОТ) сапонины.

Fig. 1. Main groups of ginseng ginsenosides include protopanaxadiols (PPD, R3 = H), protopanaxatriols (PPT, R1 = H) and octyllolic (OT) saponins.

Результаты и их обсуждение

Основные группы гинсенозидов женьшеня представлены тремя классами тритерпеновых гликозидов: протопанаксадиольные, протопанаксагриольные и октиллольные сапонины (рис. 1). Гинсенозиды содержат тритерпеновый остов и один или несколько сахарных фрагментов. Особенностью данного класса соединений является значительное структурное разнообразие за счёт большого числа изомеров, а также из-за наличия различных заместителей при хиральном атоме углерода (C20). Такое разнообразие проявляется также в значимых отличиях их биологических эффектов, вызываемых каждым гинсенозидом при их индивидуальном изучении. Вследствие этого фармакологические свойства лекарственных препаратов из женьшеня различного происхождения и произрастающего в разных климатических условиях могут различаться. Поэтому необходимо проводить мониторинг сырья для фитопрепаратов, составлять гинсенозидные профили анализируемых образцов женьшеня, в которых необходимо идентифицировать каждый гинсенозид индивидуально.

Для определения гинсенозидных паттернов для различных представителей рода *Panax* разработано много методов, одним из лучших среди которых является ВЭЖХ

в сочетании с времяпролётной масс-спектрометрией [1, 4].

Нами была проведена оптимизация условий проведения ВЭЖХ гинсенозидов различных классов, наиболее представленных, по литературным данным, в корнях женьшеня. Условия хроматографического разделения позволяют надёжно разделять модельную смесь из 17 гинсенозидов (рис. 2), что подтверждают аналитические характеристики метода, представленные в табл. 1.

Для оценки качества лекарственных средств и соответствия как российским, так и мировых требованиям разрабатываются стандарты, которые регулируются государственной фармакопеей. Наиболее строгие требования, которые наилучшим образом характеризуют и дифференцируют препараты женьшеня, предъявляются Национальным институтом стандартов и технологий США (NIST), который регулярно разрабатывает новые калибровочные стандарты и стандартные референсные образцы (SRM) для использования при проверке новых и существующих аналитических методов. Согласно последним разработкам NIST [3], стандартизацию препаратов женьшеня необходимо проводить по 7 представителям гинсенозидов (Rb1, Rc, Re, Rb2, Rg1, Rg и Rd), а также рекомендуется определять группу 5 гинсенозидов (Rb3, Rg2, Rg3, Rh1 и Rh2), т. к. они обычно присутствуют в образцах

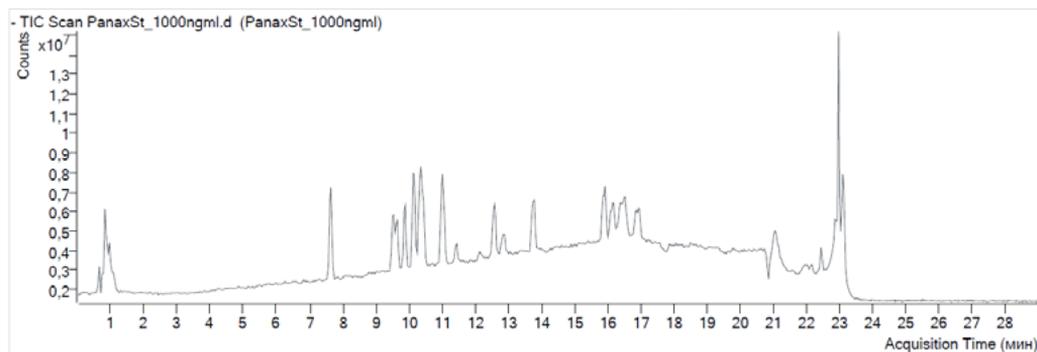


Рис. 2. Хроматограмма модельной смеси 17 гинсенозидов в отрицательном режиме регистрации ионов.
Fig. 2. Chromatogram of a model mixture of 17 ginsenosides in negative ion registration mode.

Таблица 1. Аналитические параметры метода для определяемой группы гинсенозидов
Table 1. Analytical parameters of a method for the determined group of ginsenosides

Соединение (гинсенозид)	Характеристический ион	Время удерживания, мин	Уравнение калибровочной кривой	Коэффициент корреляции (R ²)	Предел детекции, нг	Предел колич. определения, нг
Re	991,5561	7,571	$y=512,998578x-8997,875767$	0,9948	5,46	16,37
Rg1	845,4980	7,675	$y=560,406405x-9224,433714$	0,9946	5,49	16,46
Rf	799,4912	9,506	$y=68,257831x-2150,882462$	0,9995	10,50	31,51
Rb1	1153,6094	9,859	$y=239,365135x-3464,824161$	0,9981	4,83	14,48
Rc	1123,5979	10,093	$y=219,336571x-5718,973763$	0,9927	8,69	26,07
Rg2	829,5024	10,156	$y=686,548540x-10021,706687$	0,9948	4,87	14,60
Rh1	683,4439	10,357	$y=1177,247571x-22704,622605$	0,9972	6,43	19,29
Rb2	1123,6000	10,385	$y=499,333031x-8959,911865$	0,9990	5,98	17,94
Rb3	1077,5912	10,44	$y=123,744006x-1790,217793$	0,9999	4,82	14,47
Rd	991,5563	10,983	$y=512,443790x-7990,678015$	0,9990	5,20	15,59
F1	683,4438	11,013	$y=1006,971029x-21461,131424$	0,9965	7,10	21,31
Gypenoside 17	991,5540	11,447	$y=201,123132x-8219,934146$	0,9855	13,62	40,87
Rg6	811,4929	12,552	$y=630,021765x-12530,595288$	0,9948	6,63	19,89
Rg3	829,5037	13,755	$y=779,820805x-15620,495924$	0,9947	6,68	20,03
Rk1	811,4938	15,882	$y=729,843254x-13266,205095$	0,9954	6,06	18,18
Rg5	811,4920	16,113	$y=515,179674x-7905,404145$	0,9943	5,11	15,34
Rh2	667,4496	16,952	$y=851,001375x-12344,936358$	0,9972	4,84	14,51

молотого корня и экстракта из него и могут служить критерием подлинности образцов.

Анализ экстрактов «алтайского» женьшеня (табл. 2) показал, что группа мажорных гинсенозидов присутствует в наиболее высоких концентрациях — 680–5375 мкг/г сырья (рис. 3). В то время как содержание гинсенозидов из рекомендованной группы значительно ниже — на уровне 0,19–242 мкг/г сырья, за исключением Rb3, концентрация которого составила 1393,07 мкг/г сырья. Также нами идентифицирована третья группа гинсенозидов, с минорным содержанием по отношению к первым двум группам (0,7–45,8 мкг/г сырья). Однако следует заметить, что низкое содержание не обязательно означает незначительную биологическую активность и доступность. Кроме того, повысить, при необходимости, содержание гинсенозидов позволит разработка соответствующих методов и условий экстракции этих БАВ.

Проведённая сравнительная оценка содержания гинсенозидов в корнях «ал-

тайского» женьшеня и его «китайского аналога» (табл. 2, рис. 3) показала, что спектр идентифицированных гинсенозидов является сходным. При этом наблюдаются отличия по содержанию некоторых мажорных и минорных компонентов.

Заключение

Впервые проведено определение гинсенозидного профиля женьшеня, культивируемого в Республике Алтай. Установлено, что в растении содержится широкий спектр анализируемых биологически активных соединений в достаточно высоких концентрациях. Сравнительный анализ показал, что гинсенозидный профиль женьшеня Алтая по качественному и количественному составу имеет большое сходство с произрастающим в Китае.

Таким образом, женьшень, культивируемый в Республике Алтай, является перспективным сырьём для производства лекарственных средств и фитопрепаратов.

Таблица 2. Содержание гинсенозидов в экстрактах корней алтайского и китайского женьшеня
Table 2. Content of ginsenzides in the extracts from Altai and Chinese ginseng roots

Гинсенозид	Содержание, мкг/г	
	Алтайский	Китайский
Re	1841,68	1644,26
Rg1	1119,27	1066,63
Rf	690,15	1904,14
Rb1	5376,48	5341,36
Rc	3866,43	4941,39
Rg2	242,25	302,44
Rh1	18,86	67,09
Rb2	1208,55	1121,59
Rb3	1393,07	1457,41
Rd	681,85	2566,71
F1	11,47	14,24
Gypenoside 17	45,80	310,37
Rg6	1,62	1,73
Rg3	13,80	13,38
Rk1	0,70	0,67
Rg5	3,13	2,88
Rh2	0,19	0,21

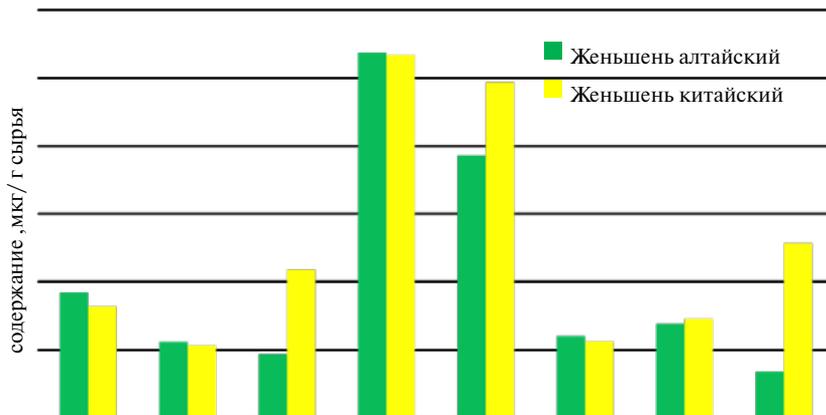


Рис. 3. Гинсенозидные профили экстрактов женьшеня алтайского и китайского происхождения по содержанию мажорных компонентов.

Fig. 3. Ginsenoside profiles of Altai and Chinese ginseng extracts in terms of the content of major components.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Козко А.А., Цицилин А.Н. Перспективы и проблемы возрождения лекарственного растениеводства в России. *Биология растений и садоводство: теория, инновации*. 2018;(146):18–25. [Kozko A.A., Tsitsilin A.N. Perspektivy i problemy vozrozhdeniya lekarstvennogo rastenievodstva v Rossii [Prospects and problems of the revival of medicinal plant growing in Russia]. *Biologiya rasteniy i sadovodstvo: teoriya, innovatsii* [Plant biology and horticulture: theory, innovation]. 2018;(146):18–25. (In Russian)]. DOI: 10.25684/NBG.scbook.146.2018.03.
2. Ставрианиди А.Н., Байгильдиев Т.М., Стекольщикова Е.А., Шпигун О.А., Родин И.А. Новые подходы к определению и групповой идентификации физиологически активных соединений в растительных материалах и коммерческой продукции методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. *Журнал аналитической химии*. 2019;74(1):67–80. [Stavrianidi A.N., Baygildiev T.M., Stekolshchikova E.A., Shpigun O.A., Rodin I.A. Novye podkhody k opredeleniyu i gruppovoy identifikatsii fiziologicheski aktivnykh soedineniy v ras-
- titel'nykh materialakh i kommercheskoy produktsii metodom vysokoeffektivnoy zhidkostnoy khromatografii s mass-spektrometricheskim detektirovaniem [New approaches to the determination and group identification of physiologically active compounds in plant materials and commercial products by high performance liquid chromatography with mass spectrometric detection] *J. of Analytical Chemistry*. 2019;74(1):67–80. (In Russian)].
3. Wilson W.B., Sander L.C. Method development for the certification of a ginsenoside calibration solution via liquid chromatography with absorbance and mass spectrometric detection. *J. Chromatogr A*. 2018;1574:114–121. DOI: 10.1016/j.chroma.2018.09.011.
4. Yang L. Development of a validated UPLC-MS/MS method for analyzing major ginseng saponins from various ginseng. *Species Molecules*. 2019;24(22):4065. DOI: 10.3390/molecules24224065.
5. Yang Y., Ju Z., Yang Y., Zhang Y., Yang L., Wang Zh. Phytochemical analysis of Panax species: A review. *J. Ginseng Res*. 2021;45(1):1–21. DOI: 10.1016/j.jgr.2019.12.009.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Левашова Анна Игоревна*, к.х.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;

e-mail: annalevashova3@gmail.com

Хвостов Даниил Владиславович, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;

e-mail: daniil_hvostov@mail.ru

Anna I. Levashova*, Cand. Sci. (Chem.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: annalevashova3@gmail.com

Daniil V. Khvostov, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: daniil_hvostov@mail.ru

Агельдинов Руслан Андреевич, ФГБУН
«Научный центр биомедицинских технологий
ФМБА России»;

e-mail: ageldinov@gmail.com

Нестеров Максим Сергеевич, ФГБУН
«Научный центр биомедицинских технологий
ФМБА России»;

e-mail: mdulya@gmail.com

Ruslan A. Ageldinov, Scientific Center
of Biomedical Technologies of the Federal Medical
and Biological Agency of Russia;

e-mail: ageldinov@gmail.com

Maxim S. Nesterov, Scientific Center of Biomedical
Technologies of the Federal Medical and Biological
Agency of Russia;

e-mail: mdulya@gmail.com

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author



СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ТЕРМОЛАБИЛЬНОГО БАКТЕРИОЦИНА, ПРОДУЦИРУЕМОГО ШТАММОМ *LIMOSILACTOBACILLUS FERMENTUM* ПЕ MD-150

А.В. Мачулин^{1*}, И.В. Косарев², Т.Н. Абашина¹, В.М. Абрамов², В.Н. Уверский³,
А.В. Карлышев⁴

¹ ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пуцинский научный центр биологических исследований РАН»

142290, Российская Федерация, Московская обл., г. Пуцино, просп. Науки, 3

² ОАО «Институт инженерной иммунологии»

142380, Российская Федерация, Московская обл., Чеховский р-н, п. Любучаны, ул. Научная, 1

³ Университет Южной Флориды

33620, США, Флорида, Тампа, просп. Е. Фаулер, 4202

⁴ Кингстонский университет в Лондоне

KT1 1LQ, Великобритания, Лондон, Суррей, Кингстон-апон-Темс, ул. Хайстрит, 53–57, Ривер Хаус

Бактерицины — бактериальные белки или пептиды, обладающие антимикробным действием и синтезируемые на рибосомах. Для высокомолекулярного бактериоцина, продуцируемого штаммом лактобацилл *Limosilactobacillus fermentum* ПЕ MD-150, имеющего статус GRAS (Generally Recognised as Safe), была обнаружена гомология аминокислотной последовательности с энтеролизиним А, продуцируемым штаммом *Enterococcus faecalis* LMG 2333. Структурно-функциональные свойства термостабильного бактериоцина, продуцируемого штаммом *L. fermentum* ПЕ MD-150, предлагается использовать для профилактики и комплексного лечения инфекционных заболеваний, вызываемых антибиотикорезистентными штаммами золотистого стафилококка.

Ключевые слова: *Limosilactobacillus fermentum*, бактериоцин, антагонистическая активность

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Мачулин А.В., Косарев И.В., Абашина Т.Н., Абрамов В.М., Уверский В.Н., Карлышев А.В. Структурно-функциональные свойства термолабильного бактериоцина, продуцируемого штаммом *Limosilactobacillus fermentum* ПЕ MD-150. *Биомедицина*. 2021;17(3E):114–117. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-114-117>

Поступила 08.04.2021

Принята после доработки 23.07.2021

Опубликована 20.10.2021

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF THERMOLABLE BACTERIOICIN PRODUCED BY THE *LIMOSILACTOBACILLUS FERMENTUM* IIE MD-150 STRAIN

Andrey V. Machulin^{1*}, Igor V. Kosarev², Tatiana N. Abashina¹, Vyacheslav M. Abramov²,
Vladimir N. Uversky³, Andrey V. Karlyshev⁴

¹ Federal Research Center

“Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences”
142290, Russian Federation, Moscow Region, Pushchino, Science Avenue, 3

² Institute of Immunological Engineering

142380, Russian Federation, Moscow Region, Chekhov District, Lyubuchany, Nauchnaya Str., 1

³ University of South Florida

33620, USA, Florida, Tampa, 4202 E. Fowler Avenue

⁴ Kingston University London

KT1 1LQ, Great Britain, London, Surrey, Kingston upon Thames, 53–57 High Str., River House

Bacteriocins are bacterial proteins or peptides exhibiting antimicrobial activity and synthesized on ribosomes. For a high molecular weight bacteriocin produced by the *Limosilactobacillus fermentum* IIE MD-150 strain and having the GRAS status (Generally Recognized as Safe), an amino acid sequence homology with enterolysin A produced by the *Enterococcus faecalis* LMG 2333 strain was found. *Lactobacillus fermentum* IIE MD-150 can be used in the prevention and complex treatment of infectious diseases caused by antibiotic-resistant strains of *Staphylococcus aureus*.

Keywords: *Limosilactobacillus fermentum*, bacteriocin, antagonistic activity

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Machulin A.V., Kosarev I.V., Abashina T.N., Abramov V.M., Uversky V.N., Karlyshev A.V. Structural and Functional Properties of Thermolable Bacteriocin Produced by the *Limosilactobacillus fermentum* IIE MD-150 Strain. *Journal Biomed.* 2021;17(3E):114–117. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-114-117>

Submitted 08.04.2021

Revised 23.07.2021

Published 20.10.2021

Белки семейства бактериоцинов рассматриваются как факторы межмикробного антагонизма, регулирующего популяции бактерий и колонизационную резистентность организма человека и животных к патогенным микроорганизмам. Штамм *Limosilactobacillus fermentum* IIE MD-150, выделенный у здорового человека, продуцирует бактериоцин, являющийся белком с уникальной аминокислотной последовательностью. У всех известных в настоящее время лактобацилл с установленной структурой генома подобный бактериоцин, обеспечивающий широкий спектр антагонистической активности штамму *L. fermentum* IIE MD-150, отсут-

ствует. Первичная структура (аминокислотная последовательность) бактериоцина содержит 371 аминокислотный остаток. Молекулярная масса бактериоцина составляет 40,8 кДа. Сигнальный пептид включает остатки 1–33. Высокомолекулярный бактериоцин, продуцируемый штаммом *L. fermentum* IIE MD-150, относится к бактериоцинам III класса. Бактериоцины этого класса представляют собой антимикробные температурочувствительные белки с молекулярной массой более 30 кДа. В этом классе бактериоцинов выделяют группу бактериолизинов, способных расщеплять пептидогликаны клеточной стенки бактерий. Обнаружена гомология

аминокислотной последовательности высокомолекулярного бактериоцина, продуцируемого штаммом лактобацилл *L. fermentum* ПЕ MD-150 и энтеролизина А, продуцируемого штаммом *Enterococcus faecalis* LMG 2333.

Энтеролизин А — белок с молекулярной массой 34,5 кДа. N-терминальный домен этого белка гомологичен каталитическим доменам молекулярных структур бактериоцинов, вызывающих деградацию протеинов клеточной мембраны бактерий, действует как мурамилидаза. Он проявляет бактерицидную активность, вызывая лизис бактерий. Энтеролизин А разрушает пептидогликановые поперечные связи, в результате этого нерастворимый ригидный пептидогликан, защищающий бактериальную клетку-мишень от внешних воздействий, превращается в растворимые фрагменты, что приводит её к гибели. Несмотря на то, что энтерококки включены в состав молочнокислых бактерий, отношение к этим микроорганизмам не однозначно. С одной стороны, энтерококки входят в состав нормальной микрофлоры ЖКТ человека и животных и играют важ-

ную роль в обеспечении колонизационной резистентности тонкой и толстой кишки. С другой стороны, энтерококки содержат в своём геноме детерминанты патогенности, вирулентности и антибиотикорезистентности. По этим критериям они принадлежат к группе условно-патогенных микроорганизмов. Вид *E. faecalis* широко распространён в окружающей среде и способен вызывать заболевания инфекционной природы. *E. faecalis*, продуцирующий энтеролизин А, является возбудителем инфекций мочевыводящих путей, вагинитов, эндокардита, раневых и внутрибольничных инфекций. В то же время гомолог энтеролизина А — высокомолекулярный термолabileный бактериоцин, продуцируемый штаммом лактобацилл *L. fermentum* ПЕ MD-150, имеющим статус GRAS (Generally Recognised as Safe), в геноме которого отсутствуют детерминанты патогенности, вирулентности и антибиотикорезистентности, будет иметь большое значение для профилактики и комплексного лечения инфекционных заболеваний, вызываемых антибиотикорезистентными штаммами золотистого стафилококка.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Мачулин Андрей Валериевич*, к.б.н., ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»;

e-mail: and.machul@gmail.com

Косарев Игорь Васильевич, к.б.н., ОАО «Институт инженерной иммунологии»;

e-mail: kosarev-52@mail.ru

Абашина Татьяна Николаевна, к.б.н., ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»;

e-mail: tnabashina@gmail.com

Абрамов Вячеслав Михайлович, д.б.н., проф., ОАО «Институт инженерной иммунологии»;

e-mail: slavab2017@mail.ru

Andrey V. Machulin*, Cand. Sci. (Biol.), Federal Research Center “Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences”;

e-mail: and.machul@gmail.com

Igor V. Kosarev, Cand. Sci. (Biol.), Institute of Immunological Engineering;

e-mail: kosarev-52@mail.ru

Tatiana N. Abashina, Cand. Sci. (Biol.), Federal Research Center “Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences”;

e-mail: tnabashina@gmail.com

Vyacheslav M. Abramov, Dr. Sci. (Biol.), Prof., Institute of Immunological Engineering;

e-mail: slavab2017@mail.ru

Уверский Владимир Николаевич, д.ф.-м.н.,
проф., Университет Южной Флориды;

e-mail: vuversky@usf.edu

Карлышев Андрей Владимирович, к.б.н.,
проф., Кингстонский университет в Лондоне;

e-mail: a.karlyshev@kingston.ac.uk

Vladimir N. Uversky, Dr. Sci. (Phys.-Math.), Prof.,
University of South Florida;

e-mail: vuversky@usf.edu

Andrey V. Karlyshev, Cand. Sci. (Biol.), Prof.,
Kingston University London;

e-mail: a.karlyshev@kingston.ac.uk

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

<https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-118-121>



ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ОРИГИНАЛЬНОГО ПРЕЦИЗИОННОГО МНОГОКАНАЛЬНОГО АНАЛОГОВО-ЦИФРОВОГО ПРЕОБРАЗОВАТЕЛЯ В ЭЭГ-ИССЛЕДОВАНИЯХ В СПОРТЕ

С.Ю. Харитонов*, Ю.В. Фокин

ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»
143442, Российская Федерация, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, 1

Аппаратные высокоточные средства и инновационные технологии, разрабатываемые для анализа активности и нейровизуализации интрацентральных отношений головного мозга с помощью электроэнцефалографических методов, позволяют проводить необходимую диагностику и коррекцию функционального состояния спортсменов, прогнозировать психоактивные свойства биологически активных соединений и их комбинаций, повышать качество результатов клинических исследований нейропсихоактивных средств и оптимизировать их практическое применение.

Ключевые слова: нейровизуализация, нормализация (нормирование), кошки, электроды, электрограммы головного мозга (ЭГМ), нормализованная ЭГМ (НЭМ), быстрое преобразование Фурье (БПФ), аналогово-цифровой преобразователь (АЦП), спорт

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Харитонов С.Ю., Фокин Ю.В. Использование оригинального прецизионного многоканального аналогово-цифрового преобразователя в ЭЭГ-исследованиях в спорте. *Биомедицина*. 2021;17(3E):118–121. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-118-121>

Поступила 20.04.2021

Принята после доработки 17.05.2021

Опубликована 20.10.2021

USE OF AN ORIGINAL PRECISION MULTICHANNEL ANALOGUE-DIGITAL CONVERTER IN EEG RESEARCH IN SPORT

Sergey Yu. Kharitonov*, Yuriy V. Fokin

Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia
143442, Russian Federation, Moscow Region, Krasnogorsk District, Svetlye Gory Village, 1

High-precision hardware tools and innovative technologies developed for the analysis of activity and neuroimaging of intracentral relations of the brain using electroencephalographic methods are important for the diagnostics and correction of the functional state of athletes, prediction of the psychoactive properties of biologically active compounds and their combinations, improvement of the results of clinical studies of neuropsychotropic drugs to optimize their practical application.

Keywords: neuroimaging, normalization, cats, electrodes, brain electrograms, normalized brain electrograms, Fast Fourier transform, analogue-digital converter, sport

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Kharitonov S.Yu., Fokin Yu.V. Use of an Original Precision Multichannel Analogue-Digital Converter in EEG Research in Sport. *Journal Biomed.* 2021;17(3E):118–121. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-118-121>

Submitted 20.04.2021

Revised 17.05.2021

Published 20.10.2021

Современные реалии диктуют необходимость ежедневно анализировать огромное количество информации, быстро и эффективно решать поставленные задачи, добываясь максимальной концентрации и высокой продуктивности. Одним из направлений, в которых эти требования предъявляются в наибольшей степени, является профессиональная подготовка спортсменов.

Ряд показателей, такие как электроэнцефалограмма (ЭЭГ), электрокардиограмма (ЭКГ), электромиограмма (ЭМГ) и прочие, являются результатом измерения разности электрических потенциалов между двумя участками кожи человека. Другие показатели, такие как амплитуда и частота дыхания, тремор и ускорение движения конечности, являются результатом преобразования неэлектрических процессов в электрический сигнал с помощью специальных датчиков, размещаемых на теле испытуемого.

Полученные электрические сигналы поступают на вход специальной аппаратуры, включающей усилители и фильтры сигнала, а также аналогово-цифровой преобразователь (АЦП), который преобразует электрический сигнал в ряд цифровых значений, передаваемых на компьютер. Компьютер с помощью специального программного обеспечения позволяет визуализировать (показывать на экране или распечатывать на бумаге) исследуемые показатели и проводить их математическую обработку, например, спектральный анализ. После постановки регистрирующих электродов и соединения их с энцефалографом необходимо усилить сигналы, составляющие милливольты, на несколько порядков; исключить влияние электрических полей, создающих «наводки»

и искажающих интересующие потенциалы; выделить необходимый потенциал из суммы различных электрохимических процессов, происходящих в организме (электрическая активность кожи, мышц, движения глаз и т. д.) [4].

Электроэнцефалография развивается параллельно с совершенствованием электронных усилителей и компьютерной техники. Современные компьютерные методы анализа ЭЭГ позволяют локализовывать источники и строить карты электрической активности мозга, проводить сложные виды неклинического и клинического анализа.

Цифровая обработка сигналов является фундаментальным принципом построения современных ЭЭГ-комплексов, её качество зависит от предварительной обработки сигнала и АЦП. Технические характеристики повышаются насыщенностью микропроцессорными интегральными схемами, использованием высокопроизводительных интерфейсов для связи с компьютером. Высокоточные АЦП обеспечивают значительную частоту дискретизации и повышенные разрядности АЦП, увеличивая входной динамический диапазон сигнала [1].

Прецизионные многоканальные АЦП с оценочным программным обеспечением позволяют конфигурировать все функциональные возможности преобразователя через доступный интерфейс работы с регистрами и проводить анализ с выводом цифровых данных и построением графических результатов в реальном времени. Устройство может использоваться как многоканальный осциллограф, спектроанализатор, а также полноценный электронный

самописец-регистратор с возможностью сохранения данных на жёстком диске компьютера без разрывов и ограничений по времени записи. Среди преимуществ данного оборудования:

- сверхнизкая погрешность измерений;
- прецизионные 18-битные измерения на высокой частоте (1 МГц на канал);
- отсутствие межканального прохождения независимо от частоты преобразования;
- высокоточные измерения независимо от выходного сопротивления источников сигналов;
- возможность измерения высоковольтных сигналов напрямую через резистивные делители;
- высокий входной импеданс всех каналов при любом режиме работы;
- готовые библиотеки, исключающие необходимость предварительной градуировки и программирования;
- возможность одновременного сбора, обработки, визуализации и целостного сохранения в течение неограниченного времени.

Данное оборудование адаптировано под поставленные задачи и успешно применяется в научной работе НЦБМТ ФМБА России, направленной на нейровизуализа-

цию интрацентральных отношений головного мозга, анализ когнитивных функций и иных информативных параметров функционального состояния крупных лабораторных животных (кошек) с дальнейшей экстраполяцией результатов в отношении медицинских работников, спортсменов и спецконтингента [2, 3].

В настоящее время анализ ЭЭГ является, например, единственно доступным объективным способом изучения работы головного мозга спортсменов, задействованных в стрелковых видах спорта [6–8]. Установлено, что у спортсменов ациклических видов спорта сила мышечного сокращения коррелирует с усилением мощности высокочастотных составляющих ЭЭГ практически по всей поверхности коры, состояние утомления характеризуется преимущественным снижением активности лобных зон коры головного мозга [5].

Инновационные технологии детекции и распознавания сложных преобразований ЭГ мозга обеспечивают совершенствование исследований в области фармакологической коррекции интрацентральных отношений головного мозга, в т. ч. с помощью нейропсихоактивных средств направленного действия.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Ветвицкий Е.В., Плотников А.В., Прилуцкий Д.А., Селищев С.В. Применение универсального последовательного интерфейса USB в компьютерных медицинских комплексах. *Медицинская техника*. 2000;4:3–7. [Vetvitskiy E.V., Plotnikov A.V., Prilutskiy D.A., Selishchev S.V. Primenenie universal'nogo posledovatel'nogo interfeysa USB v komp'yuternykh meditsinskikh kompleksakh [Application of the universal serial USB interface in computer medical complexes]. *Medicinskaya tekhnika [Medical equipment]*. 2000;4:3–7. (In Russian)].
2. Каркищенко Н.Н. *Фармакология системной деятельности мозга*. Ростов: Ростиздат, 1975:152. [Karkischenko N.N. *Farmakologiya sistemnoy deyatelnosti mozga [Pharmacology of systemic activity of the brain]*. Rostov: Rostizdat Publ., 1975:152. (In Russian)].
3. Каркищенко Н.Н., Фокин Ю.В., Каркищенко В.Н., Табожкова Л.А., Харитонов С.Ю., Алимкина О.В. Новые подходы к оценке интрацентральных отношений по показателям оперантного поведения и электрограмм мозга кошек. *Биомедицина*. 2018;4:4–17. [Karkischenko N.N., Fokin Yu.V., Karkischenko V.N., Taboyakova L.A., Kharitonov S. Yu., Alimkina O.V. Novye podkhody k otsenke intratsentral'nykh otnošeniy po pokazatelyam operantnogo povedeniya i elektrogramm mozga koshek [New approaches to the assessment of intracentral relations in terms of operant behavior and electrograms of the cats brain]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2018;4:4–17. (In Russian)].
4. Напалков Д.А., Рагманова П.О., Коликов М.Б. *Аппаратные методы диагностики и коррекции функционального состояния стрелка: Метод. реком.* М.: МАКС Пресс, 2009:212. [Napalkov D.A.,

- Ratmanova P.O., Kolikov M.B. *Apparatnye metody diagnostiki i korrekcii funkcional'nogo sostoyaniya strelka [Hardware methods of diagnostics and correction of the functional state of the shooter]: Method. recom.* Moscow: MAKS Press Publ., 2009:212. (In Russian)].
5. Черный С.В., Мишин Н.П., Нагаева Е.И. Особенности электроэнцефалограммы спортсменов ациклических видов спорта. *Учёные записки Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского: серия Биология, химия.* 2016;2;68(3):45–54. [Cherniy S.V., Mishin N.P., Nagaeva E.I. Osobennosti elektroentsefalogrammy sportsmenov atsiklicheskikh vidov sporta [Features of the electroencephalogram of athletes of acyclic sports]. *Uchenye zapiski Krymskogo federal'no-go universiteta imeni V.I. Vernadskogo: seriya*
- Biologiya, himiya [Scientific notes of the Crimean Federal University named after V.I. Vernadsky: series Biology, chemistry].* 2016;2;68(3):45–54. (In Russian)].
6. Hatfield D.B., Haufler A.J., Hung T.-M., Spalding T.W. Electroencephalographic studies of skilled psychomotor performance. *J. of Clinical Neurophysiol.* 2004;21(3):144–156.
7. Haufler A.J., Spalding T.W., Santa Maria D.L., Hatfield D.B. Neurocognitive activity during a self-paced visuospatial task: Comparative EEG profiles in marksmen and novice shooters. *Biological Psychology.* 2000;53:131–160. DOI: 10.1016/S0301-0511(00)00047-8.
8. Kerick S.E., Doudlass L.W., Hatfield B.D. Cerebral cortical adaptations associated with visuomotor practice. *Med. Sci. Sports Exerc.* 2004;36(1):118-129. DOI: 10.1249/01.MSS.0000106176.31784.D4.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Харитонов Сергей Юрьевич*, ФГБУН
«Научный центр биомедицинских технологий
ФМБА России»;

e-mail: zetroks5@gmail.com

Фокин Юрий Владимирович, к.б.н., ФГБУН
«Научный центр биомедицинских технологий
ФМБА России»;

e-mail: fokin@scbmt.ru

Sergey Yu. Kharitonov*, Scientific Center
of Biomedical Technologies of the Federal Medical
and Biological Agency of Russia;

e-mail: zetroks5@gmail.com

Yuriy V. Fokin, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Center
of Biomedical Technologies of the Federal Medical
and Biological Agency of Russia;

e-mail: fokin@scbmt.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

<https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-122-126>



ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ПРОИЗВОДНЫХ ДИМЕТИЛАМИНОЭТАНОЛА НА ВЫНОСЛИВОСТЬ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Е.Ю. Чистякова^{1*}, Д.С. Лисицкий¹, А.Б. Верведа²

¹ ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Минздрава России
197022, Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 14, лит. А

² ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова ФМБА России»
192019, Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, 1

В сообщении приводятся результаты оценки влияния курсового введения производных диметиламиноэтанола в различных режимах на статическую и динамическую выносливость мелких лабораторных животных на фоне тренирующих нагрузок. Наибольшее влияние на показатели статической физической выносливости животных оказал кетоглутарат, а на динамическую — малат.

Ключевые слова: актопротекторы, диметиламиноэтанол, сукцинат, альфа-кетоглутарат, малат, фумарат

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Чистякова Е.Ю., Лисицкий Д.С., Верведа А.Б. Экспериментальное изучение влияния производных диметиламиноэтанола на выносливость лабораторных животных. *Биомедицина*. 2021;17(3E):122–126. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-122-126>

Поступила 11.05.2021

Принята после доработки 25.05.2021

Опубликована 20.10.2021

EXPERIMENTAL STUDY OF THE EFFECT OF DIMETHYLAMINOETHANOL DERIVATIVES ON THE ENDURANCE OF LABORATORY ANIMALS

Elizaveta Yu. Chistyakova^{1*}, Dmitrii S. Lisitskii¹, Alexey B. Verveda²

¹ St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health Care of Russia
197376, Russian Federation, St. Petersburg, Professora Popova Str., 14, let. A

² Golikov Research Clinical Center of Toxicology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia
192019, Russian Federation, Saint Petersburg, Bekhtereva Str., 1

This article presents the results of assessing the effect of course administration of dimethylaminoethanol derivatives in various modes on the static and dynamic endurance of small laboratory animals during training loads. It was found that ketoglutarate has the greatest effect on the static physical endurance of animals, while malate — on the dynamic physical endurance.

Keywords: actoprotectors, dimethylaminoethanole, succinate, alpha-ketoglutarate, malate, fumarate

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Chistyakova E. Yu., Lisitskii D. S., Verveda A. B. Experimental Study of the Effect of Dimethylaminoethanol Derivatives on the Endurance of Laboratory Animals. *Journal Biomed*. 2021;17(3E):122–126. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-122-126>

Submitted 11.05.2021
Revised 25.05.2021
Published 20.10.2021

Введение

Производные диметиламиноэтанола представляют научный интерес как физиологически и фармакологически активные соединения с широким спектром активности, в т. ч. в отношении статической и динамической выносливости, а также координации движений [2, 5, 7]. Введение в молекулы остатков промежуточных продуктов цикла трикарбоновых кислот потенциально повышает активность соединений [3, 4].

Целью исследования явилась оценка влияния курсового введения производных диметиламиноэтанола на статическую динамическую выносливость мелких лабораторных животных на фоне тренирующих нагрузок.

Материалы и методы

Исследование проводили на аутбредных мышцах-самцах в возрасте 3 мес. массой 20–30 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария при температуре 18–26°C со свободным доступом к воде, пище, при двенадцатичасовом цикле день/ночь.

Объектами исследования были выбраны продукты взаимодействия сложного эфира диметиламиноэтанола и янтарной кислоты (ДМАЭ) с некоторыми интермедиатами цикла трикарбоновых кислот: ДМАЭ-малат, ДМАЭ-кетоглутарат, ДМАЭ-сукцинат и ДМАЭ-фумарат, синтезированные в ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России.

Животные были рандомизированы на 11 групп (n=10). На протяжении одного месяца мышам ежедневно внутривентрикулярно вводили различные производные ДМАЭ (75 мг/кг) или препарат сравнения (этилтиобензимидазол, 25 мг/кг) при разных режимах использования — за 30 мин до или сразу

после тренировочного процесса. Все исследуемые соединения предварительно растворяли в физ. р-ре. Этилтиобензимидазол вводился сразу после окончания тренировки, как средство восстанавливающего типа [1]. Животные группы отрицательного контроля получали эквивалентное количество физ. р-ра.

Тренировки мышей представляли собой ежедневный принудительный бег на беговой дорожке (тредбан) Treadmill («TSE Systems», Германия) в течение 1 ч при скорости движения ленты 0,2 м/с на протяжении 1 мес. Угол наклона ленты составлял 15° [6].

Оценку статической значимости проводили при помощи прибора для измерения силы хвата Grip Strength Meter («TSE Systems», Германия) до начала исследования (фон), на 2-й и 4-й неделе тренировок.

Для оценки координации движений и динамической выносливости использовали аппарат RotaRod («Ugo Basile», Италия) [1]. Фиксировали время удержания животных на вращающемся стержне при скорости вращения 20 об./мин. Показатель оценивали перед началом тренировки — в 1-й день эксперимента (фон), а также спустя 2 и 4 недели тренировки. Если животное не падало в течение 5 мин, наблюдение прекращали. Увеличение времени удержания мышей на вращающемся стержне под влиянием исследуемых соединений по сравнению с интактными и контрольными животными рассматривалось как проявление улучшения координации движений и увеличение динамической физической выносливости [3].

Математико-статистический анализ результатов осуществляли с использованием пакетов Microsoft Excel 2013 и Statistica 10.0.

Результаты и их обсуждение

Сила хвата при курсовом введении исследуемых веществ перед тренировкой достоверно увеличивалась, начиная со 2-й недели тренировок в группах животных, получавших ДМАЭ-малат (на 16%, $p=0,005$) и ДМАЭ-кетоглутарат (на 15,8%, $p=0,006$), однако к 4-й неделе наилучшие показатели продемонстрировали ДМАЭ-кетоглутарат (на 19,7%, $p=0,0001$) и ДМАЭ-сукцинат (на 12,2%, $p=0,003$) по сравнению с контрольной группой и группой этилтиобензимидазола.

При введении исследуемых веществ после тренировочного процесса на 2-й неделе введения препаратов ДМАЭ-малат, ДМАЭ-кетоглутарат, ДМАЭ-фумарат и ДМАЭ-сукцинат уровень статической мышечной выносливости был статистически значимо выше ($p<0,0001$), чем в контрольной группе, в среднем на 39%, 36%, 26% и 25% соответственно. Сила хвата при курсовом введении исследуемых веществ после тренировки к 4-й неделе эксперимента достоверно ($p<0,0001$) увеличивалась по сравнению с контролем в группах животных, получавших ДМАЭ-кетоглутарат (на 21%) и ДМАЭ-малат (на 19%).

На 2-й и 4-й неделях регулярных физических нагрузок время удержания на ротароде в контрольной группе было статистически значимо больше, чем в интактной, в среднем на 58% ($p=0,009$) и на 131% ($p=0,005$) по медиане, соответственно. В группах, отобранных для оценки режима «после тренировки», были показаны сходные результаты.

Статистически значимые различия между исследуемыми группами в режиме введения препаратов «до тренировок» по показателю время удержания на ротароде с использованием дисперсионного анализа ($p=0,041$) были выявлены только через 4 недели.

Апостериорное сравнение с применением критерия Дуннета показало, что после

введения ДМАЭ-малата уровень исследуемого показателя на 4-й неделе был статистически значимо выше, чем в контрольной группе, в среднем на 61% ($p=0,011$). Введение остальных препаратов также увеличило время удержания на ротароде, однако уровень различий с группой контроля был статистически не значимым.

P-уровни апостериорных сравнений с использованием критерия Ньюмана — Кеулса после введения всех исследуемых препаратов превышали уровень значимости (0,05), что свидетельствовало об отсутствии значимых различий между исследуемыми препаратами по показателю время удержания на ротароде в режиме «до тренировки».

В режиме «после тренировки» статистически значимые различия с использованием One Way ANOVA ($p<0,0001$) между всеми группами по времени удержания на ротароде также, как и в режиме «до тренировки», были установлены после 4 недель «тренировок». После введения этилтиобензимидазола, ДМАЭ-фумарата и -малата, на 4-й неделе обследования уровень изучаемого показателя был статистически значимо выше, чем в контрольной группе, в среднем на 48% ($p=0,001$), 34% ($p=0,013$) и 33% ($p=0,013$) соответственно. В то же время отсутствовали различия между показателями контроля с группами ДМАЭ-кетоглутарат и -сукцинат.

Более низкие значения переменной — время удержания на ротароде после введения подгрупп препаратов ДМАЭ-кетоглутарат и -сукцинат через 4 недели «тренировок» — в сравнении с аналогичным показателем в подгруппах этилтиобензимидазола, ДМАЭ-фумарата и -малата обусловили статистически значимые различия между ними после проведения апостериорных сравнений с использованием критерия Ньюмана — Кеулса.

Оценку влияния отдельных соединений на показатели физической работоспособности проводили на основе сравнения по-

казателей абсолютного прироста уровней динамической работоспособности относительно фонового уровня при различных режимах введения. Принимая во внимание, что этилтиобензимидазол (как средство восстанавливающего типа действия) для всех режимов вводился после физической нагрузки, сравнение полученных данных с ним не проводили [1, 6].

В контрольной группе животные не различались между собой по показателям прироста. Через 2 недели после начала введения исследуемых соединений статистически значимые различия в абсолютном приросте показателя динамической физической работоспособности отмечены только после введения ДМАЭ-сукцината. При введении препаратов после тренировки уровень этого показателя был в среднем на 49% ниже ($p=0,035$), чем до тренировки.

Через 4 недели тренировок статистически значимые различия между режимами введения отмечены для большей части исследуемых препаратов. Установлено, что после введения ДМАЭ-кетоглутарата и -сукцината в режиме «после тренировки» уровень показателя был ниже, чем в режиме «до тренировки», на 50% ($p=0,002$) и 45% ($p=0,035$) соответственно. Аналогичное соотношение (превышение значений до тренировки по сравнению с таковыми после тренировки), не достигшее уровня статистической значимости, отмечено после

введения препарата ДМАЭ-малата, обратное — для ДМАЭ-фумарата.

Выводы

1. Наибольшее влияние на показатели статической физической выносливости животных оказал ДМАЭ-кетоглутарат. Так, вне зависимости от режима введения (до тренировки или после) произошло повышение статической выносливости на 20% (достоверные значения по сравнению с контролем).

2. На динамическую физическую выносливость мелких лабораторных животных наибольшее влияние оказал ДМАЭ-малат. При режиме введения «до тренировки» он повышает динамическую выносливость на 61%, в режиме введения «после тренировки» — на 33% (достоверные значения по сравнению с контролем).

3. Наибольшую эффективность продемонстрировал режим введения «после тренировки». Так, после 4 недель эксперимента произошло увеличение времени удержания на вращающемся стержне у групп, получавших ДМАЭ-малат и ДМАЭ-фумарат. Статическая выносливость в группах ДМАЭ-сукцинат, ДМАЭ-кетоглутарат при этом увеличилась в среднем на 80 и 90% соответственно по сравнению с фоном (спустя 4 недели). Все результаты сопоставимы с показателями в группе животных, получавших этилтиобензимидазол.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Оковитый С.В., Радько С.В. Влияние различных фармакологических веществ на восстановление физической работоспособности после нагрузки в эксперименте. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2018;81(4):28–32. [Okovitiy S.V., Rad'ko S.V. Vliyaniye razlichnykh farmakologicheskikh veshchestv na vosstanovlenie fizicheskoy rabotosposobnosti posle nagruzok v eksperimente]. *Experimental and Clinical Pharmacology*. 2018;4:28–32. (In Russian)].
2. Сысоев Ю.И., Титович И.А., Оковитый С.В. Производные этаноламина как нейропротекторные средства. *Фармация*. 2019;68(1):48–55. [Sysoev Ju.I., Titovich I.A., Okovitiy S.V. Proizvodnyye etanolamina kak neyroprotektornyye sredstva [Ethanolamine derivatives as neuroprotective agents]. *Pharmacy*. 2019;1:48–55. (In Russian)].
3. Шустов Е.Б., Каркищенко В.Н., Семёнов Х.Х. и др. Поиск закономерностей, определяющих антигипоксическую активность соединений с ноотропным и нейропротекторным действием. *Биомедицина*. 2015;1:18–23. [Shustov E.B.,

- Karkischenko V.N., Semjonov H.H., et al. Poisk zakonornostey, opredelyayushchikh antigipoksicheskuyu aktivnost' soedineniy s nootropnym i neyroprotektoornym deystviem [Search for patterns that determine the antihypoxic activity of compounds with nootropic and neuroprotective effects]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2015;1:18–23. (In Russian).
4. He W., Miao F., Lin D., et al. Citric acid cycle intermediates as ligands for orphan G-protein-coupled receptors. *Nature*. 2004;429:188–193. DOI: 10.1038/nature02488.
 5. Malanga G. New insights on dimethylaminoethanol (DMAE) features as a free radical scavenger. *Drug Metabolism Letters*. 2012;6(1):54–59. DOI: 10.2174/187231212800229282.
 6. Oh S., Oliynyk S., Actoprotectors. *New class of pharmacological agents*. Seoul: Aprerio Publ., 2015:150.
 7. Shipkowski K.A., Sanders J.M., McDonald J.D., et al. Comparative disposition of dimethylaminoethanol and choline in rats and mice following oral or intravenous administration. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2019;51. DOI: 10.1016/j.taap.2019.05.011.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Чистякова Елизавета Юрьевна*, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России;

e-mail: elizaveta.chistyakova@pharminnotech.com

Лисицкий Дмитрий Сергеевич, к.б.н., ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России;

e-mail: dmitrii.lisitskii@pharminnotech.com

Верведа Алексей Борисович, к.м.н., ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова ФМБА России»;

e-mail: aleksivan02@rambler.ru

Elizaveta Yu. Chistyakova*, St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health Care of Russia;

e-mail: elizaveta.chistyakova@pharminnotech.com

Dmitrii S. Lisitskii, Cand. Sci. (Biol.), St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health Care of Russia;

e-mail: dmitrii.lisitskii@pharminnotech.com

Alexey B. Verveda, Cand. Sci. (Med.), Golikov Research Clinical Center of Toxicology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: aleksivan02@rambler.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

<https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-127-132>



ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОДЕЛИ СОЛИДНОЙ ФОРМЫ АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА У МЫШЕЙ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ РАННИХ И ОТДАЛЁННЫХ ПОСЛЕДСТВИЙ ГИПОФРАКЦИОНИРОВАННОГО ПРОТОННОГО ОБЛУЧЕНИЯ

В.Е. Балакин¹, Т.А. Белякова^{1*}, О.М. Розанова², Е.Н. Смирнова², А.Е. Шемяков^{1,2},
Н.С. Стрельникова¹

¹ Филиал «Физико-технический центр» ФГБУН Физический институт им. П.Н. Лебедева РАН
142281, Российская Федерация, Московская обл., Протвино, Академический пр., 2

² ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН
142290, Российская Федерация, Московская обл., Пушкино, ул. Институтская, 3

Исследовано действие тонкого сканирующего пучка протонов в дозах 60 и 80 Гр на солидную форму асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) у мышей. Показано, что мыши с индуцированной АКЭ являются удобной моделью для исследования схем гипофракционирования при протонной терапии.

Ключевые слова: нелинейные мыши SHK, асцитная карцинома Эрлиха, протоны

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Балакин В.Е., Белякова Т.А., Розанова О.М., Смирнова Е.Н., Шемяков А.Е., Стрельникова Н.С. Использование модели солидной формы асцитной карциномы Эрлиха у мышей для исследования ранних и отдалённых последствий гипофракционированного протонного облучения. *Биомедицина*. 2021;17(3E):127–132. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-127-132>

Поступила 14.04.2021

Принята после доработки 24.06.2021

Опубликована 20.10.2021

STUDY OF EARLY AND REMOTE EFFECTS OF HYPOFRACTIONATED PROTON IRRADIATION IN A MODEL OF SOLID EHRLICH ASCITES CARCINOMA IN MICE

Vladimir E. Balakin¹, Tatiana A. Belyakova^{1*}, Olga M. Rozanova², Elena N. Smirnova²,
Alexander E. Shemyakov^{1,2}, Natalia S. Strelnikova¹

¹ Branch “Physics and Technology Center” of the P.N. Lebedev Physical Institute
of the Russian Academy of Sciences
142281, Russian Federation, Moscow Region, Protvino, Akademicheskoy Passage, 2

² Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of the Russian Academy of Sciences
142290, Russian Federation, Moscow Region, Pushchino, Institutskaya Str., 3

The effect of a pencil scanning beam of protons at doses of 60 and 80 Gy on the solid form of Ehrlich ascites carcinoma (EAC) in mice was studied. It was shown that mice with induced EAC are a convenient model for studying hypofractionation schemes under proton therapy.

Keywords: non-inbred mice SHK, Ehrlich ascites carcinoma, protons

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Balakin V.E., Belyakova T.A., Rozanova O.M., Smirnova E.N., Shemyakov A.E., Strelnikova N.S. Study of Early And Remote Effects of Hypofractionated Proton Irradiation in a Model of Solid Ehrlich

lich Ascites Carcinoma in Mice. *Journal Biomed.* 2021;17(3E):127–132. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-127-132>

Submitted 14.04.2021

Revised 24.06.2021

Published 20.10.2021

Введение

В мире с каждым годом растёт количество онкологических заболеваний, основным методом лечения которых является лучевая терапия. В последние годы появились новые способы лечения рака с использованием высокоэнергетических протонов и ускоренных ионов углерода, направленные на повышение эффективности облучения опухолей и снижения побочных эффектов в здоровых тканях. Наиболее перспективным и активно развивающимся направлением в ядерной медицине в нашей стране является протонная терапия (ПТ) с использованием технологии тонкого сканирующего пучка протонов (ТСПП). Применение ТСПП позволяет снизить интегральную лучевую нагрузку на тело пациента в сравнении с другими методами ПТ, а также с современными методами фотонной терапии, что значительно уменьшает риск осложнений и развития рецидивов [4]. Для более эффективного использования возможностей ТСПП и расширения областей его применения в радиотерапии опухолей необходимо разрабатывать принципиально новые схемы облучения, наиболее перспективным из которых является гипофракционированное облучение, при котором за счёт увеличения однократной дозы сокращается время лечения. В связи с этим возникает проблема поиска удобных экспериментальных моделей опухолей у животных, позволяющих оценивать в зависимости от объёма облучаемой ткани, дозы одной фракции, интервала между фракциями и суммарной дозы облучения не только противоопухолевую эффективность и ранние лучевые последствия, но и наблюдать за рецидивами

и развитием других отдалённых реакций в течение всей жизни.

Модель аденокарциномы Эрлиха (АКЭ) широко и достаточно давно используется на лабораторных мышах для исследования противоопухолевого действия различных видов излучений, наночастиц, при тестировании широкого спектра фармакологических и природных препаратов [2, 5]. Это агрессивная, быстрорастущая карцинома, солидная форма которой не метастазирует и не дифференцирована, что удобно для исследования. Сплошную форму АКЭ можно перевивать в разные локализации на теле животного, существует возможность точного контроля облучаемого объёма опухоли, а также регистрации кожных лучевых реакций.

Ранее нами на этой модели опухоли на мышах было показано влияние облучаемого объёма опухоли АКЭ на противоопухолевую эффективность гипофракционированного облучения протонами и отсутствие зависимости эффекта от времени между фракциями [1].

Целью работы являлось исследование действия ТСПП при гипофракционированном облучении в дозах 60 и 80 Гр сплошной формы АКЭ на мышах линии SHK.

Материалы и методы

Эксперименты проводили на 8–9-недельных самцах аутбредных нелинейных мышей колонии SHK массой тела 31–35 г, полученных из филиала «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, которых разводили и содержали в стандартных условиях вивария ИТЭБ РАН (Пушино, Россия), при температуре $20 \pm 2^\circ\text{C}$, естественном световом

дне и свободным доступом к пище и воде [6]. Мыши содержались в полипропиленовых клетках по 10 особей. План экспериментов был одобрен Комиссией ИТЭБ РАН по биобезопасности и биоэтике. В качестве опухолевой модели была использована солидная форма АКЭ, клеточная линия которой получена из ФГБУН «РНЦ им. Н.Н. Блохина». Клетки АКЭ поддерживали *in vivo* в форме асцита у мышей SHK путём серийной внутрибрюшинной перевивки с интервалами 4–7 сут. Для индукции солидной АКЭ мышам внутримышечно вводили 2×10^6 клеток в бедро левой задней лапы. Затем животные были разделены на группы, которые облучались ТСПП в суммарных дозах 60 Гр и 80 Гр однократно или по схеме гипофракционирования двумя фракциями с интервалом 24 ч. Облучение мышей проводили на 5-й день после инокуляции АКЭ, когда опухолевый узел пальпировался у всех животных. Частота индукции опухоли составляла 100%. Для нахождения объёма облучаемой ткани получали томограммы мышей в водном фантоме с помощью компьютерного томографа с коническим пучком, интегрированного в ускоритель, определяли объём опухоли у каждой мыши и рассчитывали средний фактический объём опухоли, который составил $0,47 \pm 0,025$ см³. Поскольку нами было показано, что при гипофракционированном облучении ТСПП в суммарной дозе 60 Гр солидной формы АКЭ у мышей увеличение объёма облучаемой ткани не является необходимым для повышения эффективности лечения, а лучшие противоопухолевые показатели наблюдаются при облучении визуализируемого инструментально объёма опухоли [3], то в специально разработанной трёхмерной программе оконтуривания и согласно рекомендациям Международной комиссии по радиационным единицам МКРЕ-62 по выбору объёмов мишени при радиотерапии задавали макроскопический объём

опухоли, который в данной серии экспериментов равнялся $0,47$ см³.

Облучение осуществлялось на протонном синхротроне комплекса протонной лучевой терапии «Прометеус» (ФТЦ ФИАН, Протвино), который разрабатывается и эксплуатируется в рамках научно-исследовательского предприятия, что предоставляет возможность проведения физических и биологических экспериментов с применением технологии ТСПП. Мышей индивидуально фиксировали на платформе таким образом, чтобы облучаемая конечность была максимально удалена от тела, затем платформу наклонно погружали в водный фантом. Верификацию положения мыши при облучении производили с помощью лазерной системы позиционирования и съёмки проекций с совмещением текущего положения мишени с исходным с точностью 1 мм. Расчёт дозы в заданном объёме проводили в программе планирования облучения, основанной на методе Монте-Карло с итеративной динамической оптимизацией по соотношению *min/max* дозы. Погрешность поглощённой дозы протонов составляла около 5%.

После облучения следили за динамикой роста опухоли путём еженедельного измерения её размеров в течение месяца, и объём опухоли считали по формуле [7]: *объём опухоли* = $\pi/6 \times d_1 \times d_2 \times d_3$, где *d* — три ортогональных диаметра, а также регистрировали длительность ремиссии, частоту рецидивирования, динамику гибели мышей с рецидивами и продолжительность жизни мышей-опухоленосителей.

Статистическую оценку различий между группами, имеющими нормальное распределение, проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента; в остальных случаях использовался непараметрический *U*-критерий Манна — Уитни. Для сравнения результатов эксперимента, где показатели выражались в долях, достоверность различий

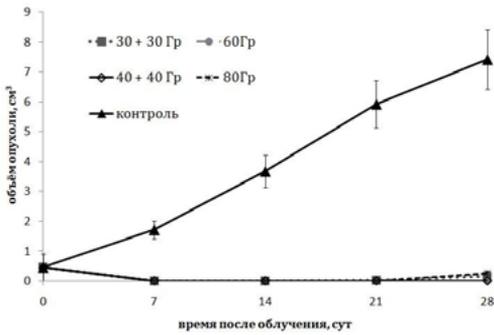


Рис. 1. Динамика роста АКЭ у мышей после облучения пучком протонов в суммарных дозах 60 и 80 Гр по сравнению с необлучёнными мышами-опухоленосителями.

Fig. 1. Dynamics of AKE growth in mice after irradiation with a proton beam at total doses of 60 and 80 Gy compared with non-irradiated tumor-bearing mice.

оценивали по критерию углового преобразования Фишера.

Результаты исследований

При сравнении противоопухолевой эффективности облучения ТСПП в дозах 60 и 80 Гр на скорость роста АКЭ в течение месяца различий выявлено не было как при фракционированном, так и при однократном облучении мышей (рис. 1). У большинства животных наблюдали полное подавление роста АКЭ.

Через 1 мес. после ПТ мы регистрировали отдалённые лучевые последствия у мышей с полной регрессией опухолевых узлов. К этому моменту в группе 30+30 Гр

наблюдали отсутствие опухоли у 77% мышей, в группе 80 Гр — у 80%, а в группах, облучённых в дозах 40+40 Гр и однократно 60 Гр, — у 100% животных. Во всех группах появление рецидивов начиналось на 35–40 сут. после облучения, но к концу 2-го мес. в группах при общей дозе облучения 60 Гр мышей с рецидивами было около 40%, в отличие от группы, облучённой в дозе 80 Гр, где их наблюдалось только 13%. У мышей, облучённых однократно в дозе 80 Гр, рецидивы появлялись быстрее, и уже к 5 мес. мыши с рецидивами погибали, а при фракционированном облучении 40+40 Гр развитие рецидивов происходило медленнее, чем в других вариантах, последний рецидив наблюдали через 8 мес., а общее количество рецидивов было на 20% меньше (табл.). Рецидивная опухоль возникла в той же конечности мыши и по структуре и динамике роста была аналогична первичной, что позволяет предположить развитие той же формы АКЭ [1, 3].

Средняя продолжительность жизни (СПЖ) мышей без рецидивов в группах с суммарной дозой 60 Гр составила 241 сут. при однократном воздействии и 262 сут. — при фракционированном облучении, а для групп 80 Гр — 270 сут. и 279 сут. соответственно.

На рис. 2 показаны кривые выживаемости мышей-опухоленосителей после ПТ. При всех схемах облучения значимых отличий

Таблица. Доля мышей с рецидивами в разные сроки после облучения тонким сканирующим пучком протонов мышей с АКЭ

Table. The proportion of mice with relapses at different times after irradiation of AKE mice with a pencil scanning proton beam

Условия облучения	Количество мышей с рецидивами, %							
	2 мес.	3 мес.	4 мес.	5 мес.	6 мес.	7 мес.	8 мес.	9 мес.
30+30 Гр	39	52	53	57	57			
60 Гр	40	40	50	60	60	60		
40+40 Гр	13	23*	27*	27*	27*	27*	30	30
80 Гр	12	50	50					

Примечание: * — различия статистически достоверны ($p < 0,05$).

Note: * — differences are statistically significant ($p < 0.05$).

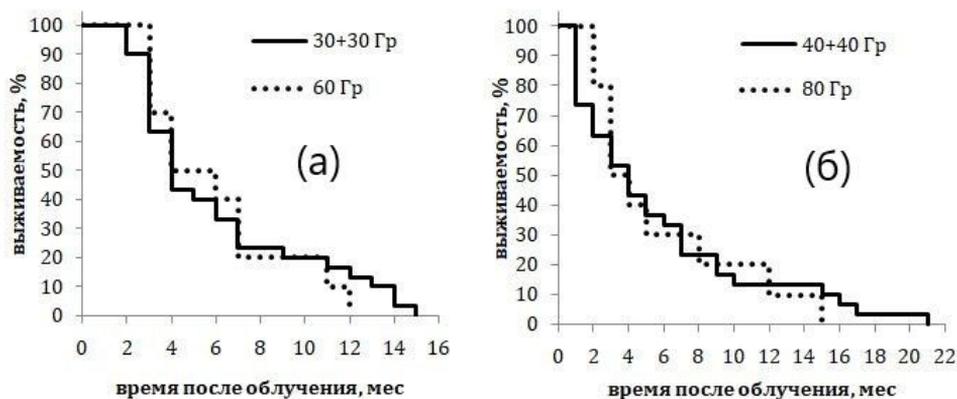


Рис. 2. Динамика выживаемости мышей-опухоленосителей после облучения тонким сканирующим пучком протонов в суммарной дозе 60 Гр (а) и 80 Гр (б).

Fig. 2. Dynamics of survival of tumor-bearing mice after irradiation with a pencil scanning proton beam at a total dose of (a) 60 Gy; (b) 80 Gy.

чий в динамике гибели животных не наблюдалось, но максимальная продолжительность жизни в группе 30+30 Гр составила 15 мес. по сравнению с однократным облучением в дозе 60 Гр, где все мыши погибли к 12 мес., а самая поздняя гибель животных наблюдалась в группе, облучённой 2 фракциями в дозе 40 Гр.

Заключение

Таким образом, при использовании ТСПП в экстремально высоких дозах для облучения солидной формы АКЭ у мышей показана высокая противоопухолевая эффективность в течение первого месяца, и СПЖ безрецидивных мышей была практически одинаковой во всех группах, однако облучение АКЭ у мышей по схеме 40+40 Гр оказалось намного эффективнее как по частоте рецидивирования опухоли, так и по влиянию на продолжительность жизни по сравнению с другими группами.

В настоящее время схемы ПТ опухолей в клиниках мало отличаются от традиционной радиотерапии с суммарной дозой облучения 40–60 Гр по 2 Гр за фракцию. Преимущества ТСПП с баллистической точностью выгрузки дозы в мишень без повреждения окружающей ткани позволяют увеличить дозу фракции в несколько раз и развивать новые схемы лечения опухолей головы и шеи, устойчивых к фотонному излучению, и особенно больных с плоскоклеточным раком, что требует дальнейшего поиска и апробации адекватных экспериментальных моделей как опухолей, так и трансгенных и нокаутных животных. Результаты проведённых экспериментов на большой выборке животных демонстрируют, что использование солидной АКЭ на мышцах колонии SHK является удобной, стабильной, хорошо воспроизводимой моделью, которая может применяться для тестирования режимов гипофракционированного облучения протонами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Балакин В.Е., Шемяков А.Е., Заичкина С.И. и др. Гипофракционированное облучение солидной формы асцитной карциномы Эрлиха у мышей тонким сканирующим пучком протонов. *Биофизика*. 2016;61(4):808–812. [Balakin V.E., Shemyakov A.E., Zaichkina S.I., et al. Gipofrakcionirovannoe oblucheniye solidnoy formy ascitnoy karcinomy Joplixa u myshej tonkim skanirujushhim puchkom protonov

- [Hypofractionated irradiation of the solid form of Ehrlich ascites carcinoma in mice by a thin scanning proton beam]. *Biophysics*. 2016;61(4):682–686. (In Russian)].
2. Abdel-Gawad E.I., Hassan A.I., Awwad S.A. Efficiency of calcium phosphate composite nanoparticles in targeting Ehrlich carcinoma cells transplanted in mice. *J. Adv. Res.* 2016;7(1):143–154. DOI: 10.1016/j.jare.2015.04.001.
 3. Belyakova T.A., Balakin V.E., Rozanova O.M., et al. The impact of target volumes of Ehrlich ascites carcinoma irradiated with a pencil scanning beam of protons at a total dose of 60 Gy on the tumor growth and remote effects in mice. In: *Eighth International Conference on radiation in various fields of research*. DOI: 10.21175/RadProc.2020.05.
 4. Durante M. Proton beam therapy in Europe: More centres need more research. *Br. J. Cancer.* 2019;120(8):777–778.
 5. Raj Kapoor B., Sankari M., Sumithra M., et al. Antitumor and cytotoxic effects of *Phyllanthus polyphyllus* on Ehrlich ascites carcinoma and human cancer cell lines. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2007;71(9):2177–2183. DOI: 10.1271/bbb.70149.
 6. Smith J., van den Broek F., Martorell J., et al. Principles and practice in ethical review of animal experiments across Europe: Summary of the report of the FELASA working group on ethical evaluation of animal experiments. *Laboratory Animals.* 2007;41(2):143–160.
 7. Sorensen B.S., Horsman M.R., Alsner J., et al. Relative biological effectiveness of carbon ions for tumor control, acute skin damage and late radiation-induced fibrosis in a mouse model. *Acta Oncol.* 2015;54(9):1623–1630. DOI: 10.3109/0284186X.2015.1069890.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Балакин Владимир Егорович, чл.-корр. РАН, д.ф.-м.н., Филиал «Физико-технический центр» ФГБУН Физический институт им. П.Н. Лебедева РАН;
e-mail: balakin@ftcfian.ru

Белякова Татьяна Анатольевна*, Филиал «Физико-технический центр» ФГБУН Физический институт им. П.Н. Лебедева РАН;
e-mail: belyakovata@lebedev.ru

Розанова Ольга Митрофановна, ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН;
e-mail: rozanova.iteb@gmail.com

Смирнова Елена Николаевна, ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН;
e-mail: smirnova.elena04@gmail.com

Шемяков Александр Евгеньевич, Филиал «Физико-технический центр» ФГБУН Физический институт им. П.Н. Лебедева РАН; ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН;
e-mail: alshemyakov@yandex.ru

Стрельникова Наталия Сергеевна, Филиал «Физико-технический центр» ФГБУН Физический институт им. П.Н. Лебедева РАН;
e-mail: petunia21.02@mail.ru

Vladimir E. Balakin, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Phys.-Math.), Branch “Physics and Technology Center” of the P.N. Lebedev Physical Institute of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: balakin@ftcfian.ru

Tatiana A. Belyakova*, Branch “Physics and Technology Center” of the P.N. Lebedev Physical Institute of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: belyakovata@lebedev.ru

Olga M. Rozanova, Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: rozanova.iteb@gmail.com

Elena N. Smirnova, Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: smirnova.elena04@gmail.com

Alexander E. Shemyakov, Branch “Physics and Technology Center” of the P.N. Lebedev Physical Institute of the Russian Academy of Sciences; Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: alshemyakov@yandex.ru

Nataliia S. Strelnikova, Branch “Physics and Technology Center” of the P.N. Lebedev Physical Institute of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: petunia21.02@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author



ИЗУЧЕНИЕ АДЪЮВАНТНЫХ СВОЙСТВ НАНОЧАСТИЦ ИЗ ЭКСТРАКТА БЕРЕСТЫ ПРИ ИММУНИЗАЦИИ МИНИ-СВИНЕЙ СВЕТЛОГОРСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ

А.Г. Берзина^{1*}, Н.В. Станкова², А.П. Каплун³, А.А. Буркова³, Н.Б. Гамалея¹

¹ *Национальный научный центр наркологии — филиал
ФГБУ «Национальный медицинский научно-исследовательский центр психиатрии и наркологии
им. В.П. Сербского» Минздрава России
119034, Российская Федерация, Москва, Кропоткинский пер., 23*

² *ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»
143442, Российская Федерация, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, 1*

³ *ФГБОУ ВО «МИРЭА — Российский технологический университет»
119454, Российская Федерация, Москва, просп. Вернадского, 78*

Проведено исследование по изучению адъювантных свойств наночастиц, выделенных из сухого экстракта бересты. Эксперименты по иммунизации проводились на мини-свиньях светлогорской популяции — биомодели человека. Животные получали две подкожные инъекции антигена в дозе 0,1 мг/кг с интервалом 14 дней. Добавление в пробы иммуногена водной суспензии наночастиц до конечной концентрации 0,5 мг/мл приводило к усилению иммунного ответа. Побочных эффектов не наблюдалось. Титры антител в сыворотках крови на 60-й и 90-й день от начала иммунизации были сопоставимы с теми, что были получены в аналогичных условиях с применением адъюванта Фрейнда (1:4000).

Ключевые слова: адъюванты, бетулин, иммунный ответ, мини-свиньи, наночастицы

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Берзина А.Г., Станкова Н.В., Каплун А.П., Буркова А.А., Гамалея Н.Б. Изучение адъювантных свойств наночастиц из экстракта бересты при иммунизации мини-свиней светлогорской популяции. *Биомедицина*. 2021;17(3E):133–138. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-133-138>

Поступила 05.04.2021

Принята после доработки 02.06.2021

Опубликована 20.10.2021

INVESTIGATION OF THE ADJUVANT PROPERTIES OF NANOPARTICLES FROM A BIRCH BARK EXTRACT USED FOR IMMUNIZATION OF MINI PIGS OF THE SVETLOGORSK POPULATION

Asya G. Berzina^{1*}, Nataliya V. Stankova², Alexandr P. Kaplun³, Anna A. Burkova³,
Nataliya B. Gamaleya¹

¹ *National Scientific Center of Narcology — Branch of the National Medical Research Center of Psychiatry
and Narcology named after V.P. Serbskiy of the Ministry of Health Care of Russia
119034, Russian Federation, Moscow, Kropotkinskiy lane, 23*

² *Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia
143442, Russian Federation, Moscow Region, Krasnogorsk District, Svetlye Gory Village, 1*

³ *MIREA — Russian Technological University
119454, Russian Federation, Moscow, Vernadskogo Avenue, 78*

The adjuvant properties of nanoparticles derived from a dry birch bark extract were studied. Immunization experiments were carried out on mini pigs of the Svetlogorsk population, a human biomodel. Animals received two subcutaneous injections of the antigen at a dose of 0.1 mg/kg with an interval of 14 days. The addition of an aqueous suspension of nanoparticles to the immunogen samples up to a final concentration of 0.5 mg/ml led to an increase in the immune response. No side effects were observed. The antibody titers in blood sera on the 60th and 90th days from the start of immunization were comparable to those obtained under similar conditions using Freund's adjuvant (1:4000).

Keywords: adjuvants, betulin, immune response, mini pigs, nanoparticles

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Berzina A.G., Stankova N.V., Kaplun A.P., Burkova A.A., Gamaleya N.B. Investigation of the Adjuvant Properties of Nanoparticles from a Birch Bark Extract Used for Immunization of Mini Pigs of the Svetlogorsk Population. *Journal Biomed.* 2021;17(3E):133–138. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-133-138>

Submitted 05.04.2021

Revised 02.06.2021

Published 20.10.2021

Введение

Разработка новых адъювантов для производства вакцинных препаратов является перспективным направлением современной биомедицины. Использование адъювантов позволяет уменьшить дозу антигена в вакцине, увеличить иммуногенность «слабых» антигенов. В последние годы в нашей стране ведётся работа по созданию экспериментальных образцов вакцин для лечения и профилактики зависимости от наркотиков опиной группы. Наркотические вещества, используемые для выработки антител к опиатам, обладают слабой иммуногенностью. Для усиления иммунного ответа в экспериментах на животных в основном используется адъювант Фрейнда. Однако данный адъювант запрещён к применению на людях. По мнению многих исследователей, наиболее перспективными адъювантами являются наночастицы (НЧ) в силу того, что они эффективно поглощаются антиген-представляющими клетками. Антиген, связанный с НЧ, будет направленно поглощаться макрофагами, что приведёт к усилению иммунного ответа. В Российском технологическом университете из экстракта бересты были получены препараты наночастиц — САНЧ (сферические аморфные наночастицы диаметром около 150 нм),

запатентованный при разработке противовирусных вакцин [4], а также новый препарат — ПНЧ (палочковидные наночастицы размером около 20×800 нм) [3], представленные на рисунке. В качестве биомодели для исследований адъювантных свойств таких наночастиц нами были использованы мини-свиньи светлогорской популяции [1].

Цель работы — изучить адъювантные свойства препаратов наночастиц из экстракта бересты при иммунизации мини-свиней светлогорской популяции в сравнении с адъювантом Фрейнда.

Материалы и методы

В качестве антигена для выработки антител использовали 6-гемисукцинильное производное морфина — 6-ГСМ, конъюгированное с бычьим сывороточным альбумином (БСА) по ранее описанной методике [2]. Оценка иммуногенных свойств наночастиц была осуществлена на мини-свиньях светлогорской популяции на базе ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Ранее мини-свиньи были использованы нами в качестве биомодели для изучения иммунного ответа к различным антигенам [1]. Эксперимент проводился на 8 поросятах из одного помета (4 самки и 4 самца в возрасте 6 мес.):

4 животных иммунизировали антигеном 6-ГСМ-БСА в дозе 0,1 мг/кг с добавлением САНЧ и ПНЧ в пробы антигена до конечной концентрации 0,5 мг/мл. Для сравнения 6-ГСМ-БСА вводился в той же дозе с добавлением адъюванта Фрейнда («Sigma»). Контрольные животные получали антиген без адъюванта. Схема иммунизации включала 2 инъекции (в/м и п/к) с интервалом 14 дней. На протяжении всего периода иммунизации у животных измеряли ректальную температуру и проводили контрольное взвешивание.

Титр антител в сыворотке крови животных определяли на 60-й и 90-й день от начала иммунизации с помощью непрямого метода ИФА, используя 2-фенилазо-производное морфина, конъюгированное с лизоцимом (ФАМ-лиз) в качестве антигена на твёрдой фазе. Кроме того, из всех сывороток до и после иммунизации выделялась суммарная фракция иммуноглобулинов с помощью метода двукратного осаждения ПЭГ-6000.

Концентрацию белка в иммуноглобулиновых фракциях выделенных образцов определяли спектрофотометрически при длине волны 280 нм.

Результаты и их обсуждение

Проверка влияния вводимых адъювантов на физиологическое состояние животных показала, что побочные эффекты у поросят наблюдались лишь при использовании адъюванта Фрейнда — повышение температуры до 40°C, воспаление на месте инъекции, а также плохая прибавка в весе в период иммунизации (45 дней). При использовании препаратов САНЧ и ПНЧ в качестве адъювантов побочных эффектов не наблюдалось.

Применение адъювантов САНЧ и ПНЧ приводило к увеличению содержания иммуноглобулинов в сыворотках крови так же, как и в случае использования адъюванта Фрейнда (табл. 1).

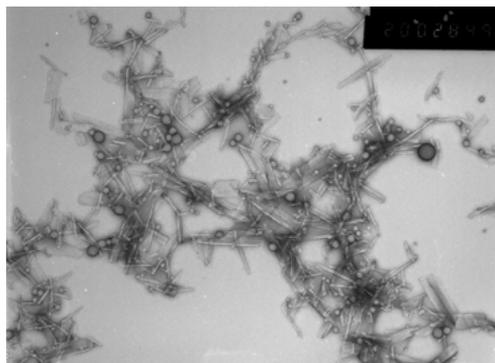


Рис. Электронная микрофотография наночастиц из экстракта бересты. В препарате видны два вида наночастиц: САНЧ и ПНЧ. Негативное контрастирование 1% уранилацетатом (ув. $\times 250\,000$).

Fig. An electron micrograph of nanoparticles from a birch bark extract. Two types of nanoparticles are visible in the preparation: spherical amorphous nanoparticles and rod-shaped nanoparticles. Negative contrasting with 1% uranyl acetate (magn. $\times 250,000$).

Измерение титров антител к морфину при проверке на ФАМ-лиз непрямым методом ИФА на 60-й день от начала иммунизации показало, что без применения адъювантов специфические антитела присутствуют в сыворотках крови в очень низком титре (1:250) (табл. 2). Титры специфических антител у поросят, иммунизированных антигеном в смеси с САНЧ и ПНЧ, близки к титрам в случае использования адъюванта Фрейнда (1:4000). Интересно, что самки, иммунизированные антигеном с добавлением наночастиц, показали лучшие результаты, чем самцы. Через 3 мес. от начала иммунизации титры антител сохранялись практически на прежнем уровне.

Ранее, при получении первичных антител к двум производным морфина на мини-свиньях с использованием адъюванта Фрейнда, нами были получены сыворотки с более высокими титрами (1:25 000). По-видимому, на это влияло использование для иммунизации более высоких доз вводимого антигена — от 0,5 до 1 мг/кг. Однако в данном исследовании нами была специально выбрана более низкая доза — 0,1 мг/кг, для того,

Таблица 1. Содержание иммуноглобулинов в сыворотке крови поросят до и после цикла иммунизации с экспериментальными адъювантами

Table 1. Contents of immunoglobulins in the blood serum of piglets before and after the immunization cycle with experimental adjuvants

№ животного, пол	Экспериментальный адъювант	Содержание иммуноглобулинов до иммунизации, мг/мл	Содержание иммуноглобулинов после иммунизации (на 60-е сут.), мг/л
<i>Самцы</i>			
931	без адъюванта	17,0	18,0
933	адъювант Фрейнда	17,5	25,8
935	САНЧ	17,3	25,2
937	ПНЧ	17,6	28,8
<i>Самки</i>			
948	без адъюванта	17,4	18,6
950	адъювант Фрейнда	18,0	25,3
952	САНЧ	17,4	27,6
954	ПНЧ	17,5	27,9

Таблица 2. Титр специфических антител в сыворотках крови мини-свиней при использовании экспериментальных адъювантов

Table 2. The titer of specific antibodies in the blood serum of minipigs using experimental adjuvants

№ животного, пол	Экспериментальный адъювант	Титры антител при проверке в ИФА	
		на 60-й день от начала иммунизации	на 90-й день от начала иммунизации
<i>Самцы</i>			
931	без адъюванта	1:250	1:500
933	адъювант Фрейнда	1:4000	1:4000
935	САНЧ	1:1000	1:1000
937	ПНЧ	1:2000	1:2000
<i>Самки</i>			
948	без адъюванта	1:250	1:500
950	адъювант Фрейнда	1:4000	1:2000
952	САНЧ	1:4000	1:4000
954	ПНЧ	1:4000	1:4000

чтобы уловить различия в образовании специфических антител к производному морфина у животных без применения и с применением различных адъювантов к одному и тому же антигену — 6-ГСМ-БСА.

Заключение

Таким образом, проведённые исследования показывают, что наночастицы, полученные из сухого экстракта бересты, — САНЧ и ПНЧ, обладают адъювантными

свойствами, усиливают иммунный ответ аналогично применяемому на животных адъюванту Фрейнда и не оказывают негативного влияния на состояние животных. В перспективе наночастицы могут найти применение при разработке вакцинных препаратов для людей. Однако необхо-

димо проведение дальнейших доклинических исследований, в частности, с целью подбора оптимальных концентраций САНЧ и ПНЧ в сочетании с различными вводимыми антигенами при создании фармацевтических композиций вакцинных препаратов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Берзина А.Г., Станкова Н.В., Ульянова Л.И., Гамалея Н.Б., Капанадзе Г.Д. Использование мини-свиней светлогорской популяции в качестве биомодели для изучения иммунного ответа на введение иммуноглобулина G лошади. *Биомедицина*. 2016(4):47–53. [Berzina A.G., Stankova N.V., Ul'yanova L.I., Gamaleya N.B., Kapanadze G.D. Ispol'zovanie mini-svinej svetlogorskoj populjacji v kachestve biomodeli dlja izuchenija immunogo otveta na vvedenie immunoglobulina G loshadi [Svetlogorsk mini-pigs as a biomodel for studying the immune response of the horse immunoglobulin G]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2016(4):47–53. (In Russian)].
2. Гамалея Н.Б., Берзина А.Г., Шестаков К.А., Капанадзе Г.Д., Ревякин А.О., Фокин Ю.В. *Иммуноген для лечения и профилактики зависимости от опиатов*. Патент РФ № 2548802. 2015. [Gamaleya N.B., Berzina A.G., Shestakov K.A., Kapanadze G.D., Revyakin A.O., Fokin Yu.V. *Immunogen dlja lechenija i profilaktiki zavisimosti ot opiatov [Immunogen for the treatment and prevention of opiate dependence]*. Patent N 2548802 of the Russian Federation. 2015. (In Russian)].
3. Каплун А.П., Безруков Д.А., Попенко В.И., Швец В.И. Сферические аморфные наночастицы из тритерпеноидов бересты — новый тип субмикронных средств для доставки лекарственных субстанций. *Биофармацевтический журнал*. 2011;3(2):28–40. [Kaplun A.P., Bezrukov D.A., Popenko V.I., Shvets V.I. Sfericheskie amorfnye nanochasticy iz triterpenoidov beresty — novyj tip submikronnyh sredstv dlja dostavki lekarstvennyh substancij [Spherical amorphous nanoparticles from birch bark triterpenoids as a new type of submicron delivery vehicle of medicinal substances]. *Biopharmaceutical journal*. 2011;3(2):28–40. (In Russian)].
4. Красильников И.В., Николаева А.М., Иванов А.В. *Способ получения адъюванта для вирусных вакцин*. Патент РФ № 2545714. 2015. [Krasil'nikov I.V., Nikolaeva A.M., Ivanov A.V. *Sposob poluchenija ad'juvanta dlja virusnyh vakcin [A method of obtaining an adjuvant for viral vaccines]*. Patent N 2545714 of the Russian Federation. 2015. (In Russian)].

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Берзина Ася Григорьевна*, к.б.н., Национальный научный центр наркологии — филиал ФГБУ «Национальный медицинский научно-исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского» Минздрава России;

e-mail: berzina07@mail.ru

Станкова Наталия Владимировна, к.б.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;

e-mail: sinayva@yandex.ru

Каплун Александр Петрович, д.х.н., проф., ФГБОУ ВО «МИРЭА — Российский технологический университет»;

e-mail: alex.kaplun@mail.ru

Asya G. Berzina*, Cand. Sci. (Biol.), National Scientific Center of Narcology — Branch of the National Medical Research Center of Psychiatry and Narcology named after V.P. Serbskiy of the Ministry of Health Care of Russia;

e-mail: berzina07@mail.ru

Nataliya V. Stankova, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: sinayva@yandex.ru

Alexandr P. Kaplun, Dr. Sci. (Chem.), Prof., MIREA — Russian Technological University;

e-mail: alex.kaplun@mail.ru

Буркова Анна Андреевна, ФГБОУ ВО «МИРЭА — Российский технологический университет»;

Гамалея Наталия Борисовна, д.м.н., проф., Национальный научный центр наркологии — филиал ФГБУ «Национальный медицинский научно-исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского» Минздрава России;

e-mail: natgam@mail.ru

Anna A. Burkova, MIREA — Russian Technological University;

Nataliya B. Gamaleya, Dr. Sci. (Med.), Prof., National Scientific Center of Narcology — Branch of the National Medical Research Center of Psychiatry and Narcology named after V.P. Serbskiy of the Ministry of Health Care of Russia;

e-mail: natgam@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

<https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-139-143>



ВЛИЯНИЕ ЭТИЛТИОБЕНЗИМИДАЗОЛА ФУМАРАТА НА ФИЗИЧЕСКУЮ РАБОТОСПОСОБНОСТЬ МЫШЕЙ В УСЛОВИЯХ ОДНОВРЕМЕННОГО ГИПОКСИЧЕСКОГО И ГИПЕРТЕРМИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

В.Ц. Болотова^{*}, Ю.Д. Болотина, Е.Б. Шустов

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Минздрава России
197376, Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 14, лит. А

Проведена оценка влияния этилтиобензимидазола фумарата (ЭТБИФ) на физическую работоспособность мышей-самцов при одновременном воздействии гемической гипоксии и гипертермии в тесте вынужденного плавания. Показано, что ЭТБИФ (доза 25 мг/кг) является эффективным средством, которое повышает физическую работоспособность мышей самцов в условиях не только гипоксии или гипертермии, но и комплексного воздействия гипоксии и гипертермии на их организм в двухфакторной модели.

Ключевые слова: гипертермия, гипоксия, этилтиобензимидазол, работоспособность

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Болотова В.Ц., Болотина Ю.Д., Шустов Е.Б. Влияние этилтиобензимидазола фумарата на физическую работоспособность мышей в условиях одновременного гипоксического и гипертермического воздействия. *Биомедицина*. 2021;17(3E):139–143. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-139-143>

Поступила 07.05.2021

Принята после доработки 28.06.2021

Опубликована 20.10.2021

EFFECT OF ETHYLTHIOBENZIMIDAZOLE FUMARATE ON THE PHYSICAL PERFORMANCE OF MICE UNDER CONDITIONS OF SIMULTANEOUS HYPOXIC AND HYPERTHERMAL EXPOSURE

Vera Ts. Bolotova^{*}, Yuliya D. Bolotina, Evgeniy B. Shustov

St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health Care of Russia
197376, Russian Federation, St. Petersburg, Professora Popova Str., 14, let. A

The effect of ethylthiobenzimidazole fumarate (ETBIF) on physical performance with simultaneous exposure to hemic hypoxia and hyperthermia in the forced swim test was assessed. It was shown that ETBIF at a dose of 25 mg/kg increases the physical performance of male mice not only under the conditions of hypoxia or hyperthermia, but also under the combined effects of hypoxia and hyperthermia in a two-factor model.

Keywords: hyperthermia, hypoxia, ethylthiobenzimidazol, physical performance

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

For citation: Bolotova V.Ts., Bolotina Yu.D., Shustov E.B. Effect of Ethylthiobenzimidazole Fumarate on the Physical Performance of Mice under Conditions of Simultaneous Hypoxic and Hyperthermal Exposure. *Journal Biomed*. 2021;17(3E):139–143. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-139-143>

Submitted 07.05.2021

Revised 28.06.2021

Published 20.10.2021

Введение

Жизнь современного человека сопряжена с воздействием разнообразных неблагоприятных факторов окружающей среды. Среди метеоусловий особое место занимает температура окружающей среды. Кратковременное пребывание в условиях гипертермии приводит к метаболическим и функциональным изменениям на молекулярном, клеточном и тканевом уровнях [5]. Поэтому поиск безопасных и высокоэффективных препаратов для поддержания физической работоспособности человека в неблагоприятных температурных условиях является актуальным.

Целью исследования является изучение влияния этилтиобензидазола фумарата (ЭТБИФ) на физическую работоспособность мышечных тканей в условиях одновременного гипоксического и гипертермического воздействия.

Материалы и методы

Исследование проводилось на белых беспородных мышцах-самцах массой 18–21 г, полученных из питомника «Рапполово» (Ленинградская обл.) и прошедших 14-дневный карантин. Содержание и обращение с животными в эксперименте соответствовали требованиям приказа Минздрава России от 01.04.2016 № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики». Протокол эксперимента был одобрен биоэтической комиссией ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России. Животные содержались в вентилируемых клетках при температуре воздуха 20–22°C, относительной влажности 40–60%, световом режиме 12:12, на обычном пищевом рационе со свободным доступом к воде и корму.

Исследования в условиях одновременно-го воздействия на организм двух неблагоприятных факторов проводились по схеме двухфакторного дисперсионного анализа. В качестве интегрального показателя функционального состояния и переносимости экстремального воздействия нами была выбрана способность животных выполнять физические нагрузки. Эффективность средств фармакологической коррекции оценивалась по динамике показателя физической работоспособности — времени плавания животных с грузом в 5% от массы тела в воде: для термокомфортных условий — 22–24°C, для условий гипертермии — 39–41°C [3]. Умеренная интенсивность гипоксического воздействия обеспечивалась внутрибрюшинным введением метгемоглинообразователя — нитрита натрия в дозе 50 мг/кг [2]. Выполнение плавательной нагрузки осуществлялось через 30 мин после введения нитрита натрия.

В качестве объекта исследования было выбрано новое соединение — этилтиобензидазола фумарат (ЭТБИФ), которое синтезировано на кафедре органической химии СПХФУ. Экспериментально была установлена эффективная доза ЭТБИФ, которая составляет 25 мг/кг. В качестве референтного препарата использовался этилметилгидроксипиридина сукцинат (ЭМГПС) (ООО «НПК Фармасофт», Россия), который ингибирует свободнорадикальные процессы, активизирует энергосинтетические функции митохондрий, улучшает энергетический обмен в клетке, утилизацию глюкозы и кислорода [1, 6].

В каждую группу было рандомизировано по 10 животных. Препараты вводили перорально, мыши контрольной группы получали очищенную воду в эквивалентных количествах.

Оценка эффективности средств для коррекции комплексного воздействия гипоксического и температурного (гипертермия) факторов была проведена по индексу защиты (ИЗ):

$$ИЗ_{np} = \frac{X_{np} - X_k}{X_{инт} - X_k}$$

где X — среднегрупповые значения времени плавания животных с грузом, а индексы обозначают соответствующую группу: *инт* — интактную, *к* — контрольную, *np* — с применением препарата.

Статистическая обработка результатов исследований осуществлялась методами однофакторного (тест ANOVA) и двухфакторного дисперсионного анализа в пакете статистического анализа данных табличного процессора Excel for Windows. Числовые данные, приводимые таблицы, представлены в виде: среднее арифметическое \pm стандартная ошибка среднего ($M \pm m$). Уровень доверительной вероятности был задан равным 95%.

Результаты исследований

Результаты исследования эффективности фармакологической коррекции комплексного влияния гипоксии и гипертермии на функциональное состояние лабораторных животных представлены в таблице.

Гемическая гипоксия оказывает умеренное влияние на функциональное состоя-

ние белых мышей, снижая время плавания животных (-12% , $p=0,39$). При сопоставлении значений времени плавания животных контрольной группы при нормотермии и гипертермии выявлено выраженное снижение этого показателя под влиянием теплового воздействия (-45% , $p=1,1 \times 10^{-4}$). При совместном действии обоих факторов наблюдалось выраженное высоко достоверное ($p=10^{-4}$) снижение работоспособности (-63% , $p=2 \times 10^{-4}$), практически в 3 раза по сравнению с уровнем гипоксического воздействия. Двухфакторным дисперсионным анализом установлено, что в контрольной группе влияние гипоксии на физическую работоспособность описывает 10% вариативности времени плавания ($p=0,016$), а гипертермия — 65% ($p=5 \times 10^{-6}$), взаимодействие факторов незначимо и недостоверно, неконтролируемые факторы имеют коэффициент детерминации 0,22.

ЭТБИФ дозозависимо влияет на физическую работоспособность мышей, значимость фактора дозы для влияния на гипоксию составляет 79%, гипертермии — 62%, совместного воздействия гипоксии и гипертермии — 35%, причем доза 25 мг/кг является более активной по всем направлениям коррекции. Двухфакторным дисперсионным анализом установлено, что в группе с введением ЭТБИФ в дозе 25 мг/кг влияние гипоксии на физическую работоспособность описывает 48% вариативности времени плавания ($p=2 \times 10^{-7}$), а гипертермия — 19% ($p=5 \times 10^{-5}$), взаимодействие

Таблица. Длительность вынужденного плавания животных при воздействии гемической гипоксии и гипертермии при введении ЭТБИФ (с), $M \pm m$

Table. Forced swim duration in animals with haemic hypoxia and hyperthermia and in response to ETBIF administration, $M \pm m$, s

Группа	Ситуации исследования			
	Нормоксия + нормотермия	Нормоксия + гипертермия	Гипоксия + нормотермия	Гипоксия + гипертермия
Контроль	1000 \pm 88	535 \pm 79	888 \pm 68	272 \pm 53
ЭТБИФ, 25 мг/кг	923 \pm 104	651 \pm 55	2226 \pm 135	602 \pm 82
ЭТБИФ, 50 мг/кг	580 \pm 115	175 \pm 21	1220 \pm 133	478 \pm 76
ЭМГПС, 25 мг/кг	933 \pm 26	733 \pm 24	1006 \pm 90	548 \pm 40

факторов является значимым ($D=0,23$; $p=2 \times 10^{-5}$), неконтролируемые факторы имеют коэффициент детерминации 0,10.

Введение ЭТБИФ в дозе 25 и 50 мг/кг оказывает защитное действие при комбинированном воздействии гипоксии и гипертермии (индексы защиты равны 0,45 и 0,21 соответственно), что сопоставимо с эффектом референсного препарата (индекс защиты для ЭМГПС в дозе 25 мг/кг равен 0,37).

Обсуждение результатов

Исходя из патогенеза утомления, можно полагать, что снижение устойчивости организма к физическим нагрузкам обусловлено дефицитом кислорода в мышечной ткани и нарушением обменных процессов. В ходе проведенного исследования установлено, что экстремальные факторы — гипоксия и гипертермия — ухудшают выполнение физической работоспособности мышцами-самцами. Введение животным ЭТБИФ способствовало увеличению физической ак-

тивности мышцей. Этот эффект может быть связан с уменьшением разобщения окисления с фосфорилированием, предотвращением дисфункции митохондрий и активацией синтеза митохондриальных белков, повышением активности супероксиддисмутазы и снижением уровня ПОЛ [6]. Основной эффект фумарата связан с поддержанием NADH-фумаратредуктазной реакции, обеспечивающей в анаэробных условиях образование сукцината и АТФ [4].

Выводы

Этилтиобензимидазола фумарат (доза 25 мг/кг) повышает физическую работоспособность мышцей-самцов как при гемической гипоксии, так и гипертермии. В условиях комплексного воздействия гипоксии и гипертермии фармакологический профиль этилтиобензимидазола фумарата (доза 25 мг/кг) сопоставим с действием препарата сравнения — мексидолом (доза 25 мг/кг).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Воронина Т.А. Пионер антиоксидантной нейропротекции. 20 лет в клинической практике. *Российский медицинский журнал. Серия Неврология*. 2016;7:434–438. [Voronina T.A. Pioneer antioksidantnoy neyroproteksii. 20 let v klinicheskoy praktike [Pioneer of antioxidant neuroprotection. 20 years in clinical practice]. *Russian Medical Journal. Neurology series*. 2016;7:434–438. (In Russian)].
2. Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н., Шустов Е.Б., Капанадзе Г.Д., Ревякин А.О., Семенов Х.Х. и др. *Биомедицинское (доклиническое) изучение антигипоксической активности лекарственных средств: методические рекомендации* МР21-44-2017. М.: ФМБА России, 2017:98. [Karkischenko N.N., Karkischenko V.N., Shustov E.B., Kapanadze G.D., Revyakin A.O., Semenov Kh.Kh., et al. *Biomeditsinskoe (doklinicheskoe) izuchenie antihipoksicheskoy aktivnosti lekarstvennykh sredstv [Biomedical (preclinical) study of antihypoxic activity of drugs]: Guidelines* MR21-44-2017. Moscow: FMBA of Russia, 2017:98. (In Russian)].
3. Каркищенко Н.Н. и др. *Методические рекомендации по биомедицинскому (доклиническому) изучению лекарственных средств, влияющих на физическую работоспособность*. М.: ФМБА России, 2017:134. [Karkischenko N.N., et al. *Metodicheskie rekomendatsii po biomeditsinskomu (doklinicheskomu) izucheniyu lekarstvennykh sredstv, vliyayushchikh na fizicheskuyu rabotosposobnost'* [Methodical guidelines for biomedical (preclinical) study of drugs that affect physical performance]. Moscow: FMBA of Russia, 2017:134. (In Russian)].
4. Маевский Е.И., Гришина Е.В. *Биохимические основы механизма действия фумарат-содержащих препаратов*. Российский биомедицинский журнал *MEDLINE.RU*. 2017;18(1):50–80. [Maevskij E.I., Grishina E.V. *Biohimicheskie osnovy mekhanizma dejstviya fumarat-soderzhashchih preparatov* [Biochemical basis of the mechanism of action of fumarate-containing preparations]. *Russian Biomedical Journal MEDLINE.RU*. 2017;18(1):50–80. (In Russian)].
5. Новиков В.С., Голянич В.М., Шустов Е.Б. *Коррекция функциональных состояний при экстремальных воздействиях*. 1998:544. [Novikov V.S., Golyanich V.M., Shustov E.B. *Korreksiya funktsional'nykh sostoyaniy pri ekstremal'nykh vozdeystviyakh* [Correction of functional states under extreme influences]. 1998:544. (In Russian)].

6. Оковитый С.В., Смирнов А.В. Антигипоксанты. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2001;64(3):76–80. [Okovitiĭ S.V., Smirnov A.V. Antigipoksanty [Antihypoxants]. *Experimental and Clinical Pharmacology*. 2001;64(3):76–80. (In Russian)].

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Болотова Вера Цезаревна*, к.фарм.н., доц., ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России;

e-mail: vera.bolotova@pharminnotech.com

Болотина Юлия Дмитриевна, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России;

e-mail: bolotina.yuliya@pharminnotech.com

Шустов Евгений Борисович, д.м.н., проф., ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России;

e-mail: shustov-msk@mail.ru

Vera Ts. Bolotova*, Cand. Sci. (Pharm.), Assoc. Prof., St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health Care of Russia;

e-mail: vera.bolotova@pharminnotech.com

Yuliya D. Bolotina, St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health Care of Russia;

e-mail: bolotina.yuliya@pharminnotech.com

Evgeniy B. Shustov, Dr. Sci. (Med.), Prof., St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health Care of Russia;

e-mail: shustov-msk@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

<https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-144-146>



ВЛИЯНИЕ ЭМПАГЛИФЛОЗИНА НА ТЕЧЕНИЕ НЕАЛКОГОЛЬНОЙ ЖИРОВОЙ БОЛЕЗНИ ПЕЧЕНИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

А.В. Бунят*, Д.С. Суханов

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Минздрава России
197022, Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 14, лит. А

Оценено влияние препарата группы ингибиторов SGLT-2 эмпаглифлозина на биохимическую и гистологическую картину неалкогольной жировой болезни печени у мышей.

Ключевые слова: неалкогольная жировая болезнь печени, эмпаглифлозин, мыши, стеатоз, высокожировая диета, тетрахлорметан, эпидидимальный жир, висцеральный жир

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Бунят А.В., Суханов Д.С. Влияние эмпаглифлозина на течение неалкогольной жировой болезни печени в эксперименте. *Биомедицина*. 2021;17(3E):144–146. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-144-146>

Поступила 22.05.2021

Принята после доработки 03.06.2021

Опубликована 20.10.2021

EFFECTS OF EMPAGLIFLOZIN ON THE COURSE OF NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE IN EXPERIMENT

Anna V. Bunyat*, Dmitriy S. Sukhanov

Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health Care of Russia
197376, Russian Federation, Saint Petersburg, Professora Popova Str., 14, let. A

Effects of the SGLT-2 drug of the group of empagliflozin inhibitors on the biochemical and histological picture of non-alcoholic fatty liver disease in mice was evaluated.

Keywords: non-alcoholic fatty liver disease, empagliflozin, mice, steatosis, high-fat diet, carbon tetrachloride, epididymal fat, visceral fat

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Buniat A.V., Sukhanov D.S. Effects of Empagliflozin on the Course of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Experiment. *Journal Biomed*. 2021;17(3E):144–146. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-144-146>

Submitted 22.05.2021

Revised 03.06.2021

Published 20.10.2021

Введение

За последние годы появились убедительные данные, указывающие на связь между абдоминальным ожирением с воспали-

тельной реакцией, приводящей к инсулинорезистентности и стеатозу печени [2]. Ингибиторы натрий-глюкозного котранспортера 2 являются относительно новым

классом антидиабетических препаратов, повышающих экскрецию глюкозы с мочой, назначение которых сопряжено с дополнительными благотворными эффектами, в т.ч. с потерей массы тела [3] и снижением интенсивности воспалительных реакций в тканях печени [4].

В связи с этим, **целью** экспериментального исследования являлось изучение эффектов эмпаглифлозина на мышинной модели неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП).

Материалы и методы

Эксперимент проведён на 75 мышах-самцах линии C57BL/6 массой тела 20–25 г. Животные были разделены на 3 группы (по 25 мышей в каждой): интактные животные; контрольная группа — модель НАЖБП + плацебо (вода очищенная, перорально); модель НАЖБП + эмпаглифлозин (Джардинс® в дозе 2 мг/кг в сутки перорально).

Моделирование неалкогольной жировой болезни печени проводили путём использования высокожировой диеты и инъекционного введения тетрахлорметана (CCl₄). Диета включала добавление 21,1% говяжьего жира топлёного, 41% d-фруктозы и 1,25% холестерина к стандартному корму, а также 42 г/л d-фруктозы в питьевую воду. CCl₄ вводился один раз в неделю внутривентриально в дозе 0,32 мг/г массы тела, предварительно растворённый в миндальном масле [1].

Длительность экспериментального исследования составила 20 недель и включала две контрольные точки (10-я, 20-я неделя) с выведением части животных (10–15%) для оценки массы жировых депо и гистологической картины печени в динамике.

Результаты и их обсуждение

Через 10 недель моделирования неалкогольной жировой болезни печени масса висцерального и эпидидимального жира группы животных, получающей плацебо, достоверно превышала значения интактных животных в 1,5 и 1,2 раза соответственно ($p < 0,05$). При этом в группе, получающей терапию эмпаглифлозином, масса жировых депо не увеличилась и была сопоставима с интактной группой (рис.).

К 20-й неделе исследования масса висцерального и эпидидимального жировых депо группы плацебо возросла в 2 и 3 раза по сравнению с 10-й неделей и превышала значения интактной группы в 2,4 и 2 раза ($p < 0,05$).

В интактной группе и группе, получающей лечение эмпаглифлозином, наблюдалось повышение массы жировых депо по сравнению с 10-й неделей, что, вероятно, связано с естественным ростом животных, однако достоверных различий между двумя группами выявлено не было.

Гистологически на 10-й неделе исследования печень контрольной группы животных

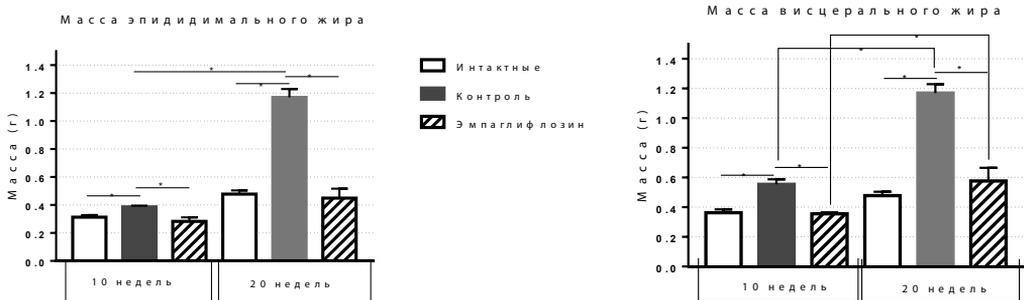


Рис. Влияние эмпаглифлозина на массу жировых депо лабораторных животных (* — $p < 0,05$).

Fig. Impact of empagliflozin on the mass of fat depots in laboratory animals (* — $p < 0.05$).

характеризовалась выраженной баллонной дистрофией, слабовыраженной жировой дистрофией от 5–15% гепатоцитов, мелко-, средне- и крупноочаговыми некрозами, а также умеренно выраженным фиброзом F2 по шкале METAVIR. К 20-й неделе степень жировой дистрофии возросла до выраженной (30–40% гепатоцитов), присутствовал тяжёлый фиброз с формированием множества септ (F3 по METAVIR).

Терапия эмпаглифлозином оказала положительное влияние. К 10-й неделе исследования наблюдались умеренно выраженная баллонная дистрофия, слабо выраженный жировой гепатоз от 1 до 5%, умеренно выраженный диффузный и слабо выраженный гранулематозный гепатит. К 20-й неделе исследования степень воспалительной ре-

акции снизилась до слабо выраженной. Распространённость жировой дистрофии не изменилась (1–5%).

Выводы

Используемая нами модель НАЖБП печени приводила к достоверному ($p < 0,05$) повышению массы жировых депо контрольной группы животных на протяжении всего экспериментального исследования и тяжёлым морфологическим повреждениям ткани печени.

Использование ингибитора SGLT-2 эмпаглифлозина не только оказало положительное влияние на развитие висцерального ожирения у лабораторных животных, но и предупредило ухудшение гистологической картины заболевания.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Castro R.E., Diehl A.M. Towards a definite mouse model of NAFLD. *Journal of Hepatology*. 2018;69:272–274.
2. Haya A., Ilhame D., Maha V., et al. Metabolic signature of obesity-associated insulin resistance and type 2 diabetes. *J. of Transl. Med.* 2019;19:348.
3. Monami M., Nardini C., Mannucci E. Efficacy and safety of sodium glucose co-transport-2 inhibitors in type 2 diabetes: A meta-analysis of randomized clinical trials. *Diabetes Obes. Metab.* 2014;16:457–466.
4. Tahara A., Kurosaki E., Yokono M., Yamajuku D., Kihara R., Hayashizaki Y., Takasu T., Imamura M., Li Q., Tomiyama H., Effects of SGLT2 selective inhibitor ipragliflozin on hyperglycemia, hyperlipidemia, hepatic steatosis, oxidative stress, inflammation, and obesity in type 2 diabetic mice. *Eur. J. Pharmacol.* 2013;715:246–255.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Бунят Анна Валерьевна*, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России;

e-mail: anna.tkacheva@pharminnotech.com

Суханов Дмитрий Сергеевич, д.м.н., проф., ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России;

e-mail: dmitriysukhanovl@mail.ru

Anna V. Bunyat*, Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health Care of Russia;

e-mail: anna.tkacheva@pharminnotech.com

Dmitriy S. Sukhanov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health Care of Russia;

e-mail: dmitriysukhanovl@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

<https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-147-150>



ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ ХОЛИНЕРГИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ В ЭФФЕКТАХ ГАМК НА ЭЛЕКТРИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ТОНКОЙ КИШКИ

Ю.В. Гурман¹, Н.С. Тропская^{1,2,*}, Т.С. Попова¹

¹ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗМ»
129090, Российская Федерация, Москва, Большая Сухаревская пл., 3

²ФГБОУ ВО «Московский авиационный институт
(национальный исследовательский университет)»
125993, Российская Федерация, Москва, Волоколамское ш., 4

В экспериментах на 14 крысах изучена роль холинергических механизмов в эффектах ГАМК на электрическую активность тонкой кишки в условиях 18-часовой пищевой депривации в хроническом эксперименте.

Введение ГАМК в дозе 70 мг/кг приводило к стимуляции фазы II (нерегулярной активности) и исчезновению фаз I (покоя) и III (регулярной активности) мигрирующего миоэлектрического комплекса (ММК). Основным эффектом М-холиноблокатора — атропина (1 мг/кг) проявлялся в исчезновении фазы III ММК. Введение ГАМК после введения атропина вызывало появление внеочередной фазы III ММК, тем самым оказывая растормаживающий эффект на регулярную (пропульсивную) активность тонкой кишки.

Таким образом, одним из механизмов действия ГАМК на электрическую активность тонкой кишки являются холинергические пути.

Ключевые слова: ГАМК, электрическая активность тонкой кишки, холинергические механизмы

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Гурман Ю.В., Тропская Н.С., Попова Т.С. Изучение роли холинергических механизмов в эффектах ГАМК на электрическую активность тонкой кишки. *Биомедицина*. 2021;17(3E):147–150. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-147-150>

Поступила 12.04.2021

Принята после доработки 17.05.2021

Опубликована 20.10.2021

THE ROLE OF CHOLINERGIC MECHANISMS IN THE EFFECTS OF GABA ON THE SMALL BOWEL ELECTRICAL ACTIVITY

Yulia V. Gurman¹, Nataliya S. Tropkaya^{1,2,*}, Tamara S. Popova¹

¹N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine of the Moscow Health Care Department
129090, Russian Federation, Moscow, Bolshaya Sukharevskaya Square, 3

²Moscow Aviation Institute (National Research University)
125993, Russian Federation, Moscow, Volokolamskoe Highway, 4

On a sample of 14 rats, the role of cholinergic mechanisms in the effects of GABA on the small bowel electrical activity under the conditions of 18-hour food deprivation in a chronic experiment was studied. Administration of GABA at a dose of 70 mg/kg resulted in stimulation of phase II (irregular activity) and the disappearance of phases I (rest) and III (regular activity) of the migrating myoelectric complex (MMC). The main effect of the M-cholinoblockator — atropine (1 mg/kg) was manifested in the disappearance

of phase III MMC. The administration of GABA after the administration of atropine caused the appearance of extraordinary phase III MMC, thereby exerting a release effect on the regular (propulsive) activity of the small intestine. Therefore, one of the mechanisms of GABA action on the electrical activity of the small intestine is cholinergic pathways.

Keywords: GABA, electrical activity of small intestine, cholinergic mechanisms

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Gurman Yu.V., Tropskaya N.S., Popova T.S. The Role of Cholinergic Mechanisms in the Effects of GABA on the Small Bowel Electrical Activity. *Journal Biomed.* 2021;17(3E):147–150. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-147-150>

Submitted 12.04.2021

Revised 17.05.2021

Published 20.10.2021

Введение

Хорошо известно, что γ -аминомасляная кислота (ГАМК) является основным тормозным медиатором в ЦНС. К настоящему времени установлены различные виды рецепторов ГАМК и их локализация в ЖКТ. Распределение ГАМК вдоль ЖКТ в более высоких концентрациях, чем в мозге, у многих видов млекопитающих, безусловно, указывает на её важную роль в функционировании ЖКТ [3]. Имеются сведения о деполяризующем влиянии ГАМК как на мембраны нейронов кишки, так и энтероцитов. Вместе с тем приводятся данные, указывающие на тормозный эффект ГАМК [1]. Необходимо отметить, что большая часть данных была получена *in vitro*, либо *in vivo* в острых экспериментах в условиях наркоза. Влияние экзогенной ГАМК на моторную функцию тонкой кишки связывают со сложным балансом стимулирующих и ингибиторных эффектов, связанных с холинергическими и NO-ергическими нейронами [1, 2].

Цель работы — оценить роль холинергических механизмов в эффектах ГАМК на электрическую активность тонкой кишки крыс в условиях пищевой депривации в хроническом эксперименте.

Материалы и методы

Исследования выполнены на 14-ти крысах-самцах популяции линий Вистар массой

тела 340–390 г в возрасте 12 мес. Протокол исследования был одобрен локальным комитетом по биомедицинской этике НИИ СП им. Н.В. Склифосовского.

Все животные содержались в лаборатории в контролируемых условиях окружающей среды при температуре 20–24°C и влажности 45–65%, с режимом освещённости с 8⁰⁰ до 20⁰⁰ — свет, с 20⁰⁰ до 8⁰⁰ — сумеречное освещение. Животные имели свободный доступ к корму и воде.

До начала экспериментов проводили операционную подготовку крыс. Под наркозом проводили срединную лапаротомию. В тощую кишку в 5 см от связки Трейтца устанавливали зонд для энтерального введения растворов. Три монополярных электрода имплантировали в серозно-мышечный слой тощей кишки на расстоянии 10, 15 и 20 см от связки Трейтца. Дополнительно в мышечный слой брюшной стенки вживляли референтный электрод. Зонд и провода электродов с помощью специальных игл-проводников выводили из брюшной полости через мягкие ткани брюшной стенки и тазовой области под кожей хвоста наружу. Брюшную полость послойно ушивали наглухо. Каждую крысу размещали в индивидуальной экспериментальной клетке. Эксперименты выполняли через 7 дней после вживления электродов и зонда. После 18-часовой пищевой депривации проводили регистрацию электрической активно-

сти трёх участков тонкой кишки в течение 60 мин (фон). Затем в первой серии в полость тощей кишки вводили 1 мл ГАМК в дозе 70 мг/кг. Во второй серии — 1 мл атропина в дозе 1 мг/кг. В третьей серии через 10 мин после введения атропина вводили ГАМК. После введения препаратов продолжали регистрацию 120 мин. Для статистического анализа использовали непараметрические критерии. Данные представляли в виде медианы и перцентилей — Me (25;75)%.

Результаты исследований

У всех животных в фоновых записях наблюдался мигрирующей миоэлектрический комплекс (ММК) — основной маркер электрической активности тонкой кишки в норме.

Фаза I (покоя) составляла 37 (30;46)%, фаза II (нерегулярной, непропульсивной) активности — 36 (33;39)%, фаза III (регулярной, пропульсивной) активности — 24 (18;30)% от периода ММК.

В 1-й серии экспериментов после введения в полость кишки ГАМК происходило изменение в структуре ММК. Эффект ГАМК начинался с 4–5 мин после её введения. Наблюдалось разрушение ММК с исчезновением фаз I и III. Нерегулярная

фаза II регистрировалась на протяжении 32 (26;34) мин.

Во 2-й серии экспериментов после введения атропина через 2–3 мин наблюдалось исчезновение регулярной, пропульсивной активности тонкой кишки (фазы III). На протяжении 14 (14;16) мин регистрировались фаза покоя и фаза нерегулярной непропульсивной активности в соотношении 45 (30;64)% — фаза I, 55 (37;100)% — фаза II.

В 3-й серии экспериментов введение атропина также как и во 2-й серии приводило к исчезновению фазы III. Введение ГАМК на фоне атропина через 5 (4;6) мин вызывало появление внеочередной фазы III ММК, тем самым оказывая растормаживающий эффект на пропульсивную активность тонкой кишки.

Выводы

1. При пищевой депривации введение ГАМК оказывает тормозный эффект на пропульсивную активность, но стимулирующий эффект на непропульсивную активность тонкой кишки.

2. На фоне блокады M-холинорецепторов введение ГАМК вызывает кратковременную стимуляцию пропульсивной активности тонкой кишки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Krantis A. GABA in the mammalian enteric nervous system. *News Physiol. Sci.* 2000;15:284–290.
2. Neal K.B., Bornstein J.C. Targets of myenteric interneurons in the guinea-pig small intestine. *Neurogastroenterol. Motil.* 2008;20(5):566–575.
3. Tedeschi L., Carai M., Frison G., et al. Endogenous γ -hydroxybutyric acid is in the rat, mouse and human gastrointestinal tract. *Life sciences.* 2003;72:2481–2488.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Гурман Юлия Валерьевна, ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗМ»;
e-mail: julka_gurman95@mail.ru

Yulia V. Gurman, N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine of the Moscow Health Care Department;
e-mail: julka_gurman95@mail.ru

Тропская Наталья Сергеевна*, д.б.н., ГБУЗ
«Научно-исследовательский институт скорой
помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗМ»;
ФГБОУ ВО «Московский авиационный инсти-
тут (национальный исследовательский универ-
ситет)»;

e-mail: ntropskaya@mail.ru

Попова Тамара Сергеевна, д.б.н., проф., ГБУЗ
«Научно-исследовательский институт скорой
помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗМ»;

e-mail: popovanutr@mail.ru

Nataliya S. Tropskaya*, Dr. Sci. (Biol.),
N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency
Medicine of the Moscow Health Care Department;
Moscow Aviation Institute (National Research
University);

e-mail: ntropskaya@mail.ru

Tamara S. Popova, Dr. Sci. (Biol.), Prof.,
N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency
Medicine of the Moscow Health Care Department;

e-mail: popovanutr@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

<https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-151-155>



ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ БУРЫХ ВОДОРОСЛЕЙ НА СТОЙКОСТЬ ЭРИТРОЦИТАРНЫХ МЕМБРАН

М.В. Мельникова*, Е.Б. Шустов, Л.Г. Кубарская, А.В. Бельская, А.А. Бондаренко,
А.С. Мелехова, Е.П. Подольская, К.А. Краснов

ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова ФМБА России»
192019, Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, 1

При исследовании различных режимов введения лабораторным животным установлены дозы и длительность введения, при которых комплексы биологически активных веществ (БАВ) водорослей *F. vesiculosus* и *S. latissima* проявляют умеренную цитопротекторную активность (15 и 30 мг/кг для *S. latissima*, 60 и 120 мг/кг для *F. vesiculosus*; трёхдневное введение). Для комплекса БАВ *F. vesiculosus* характерна более высокая в сравнении с комплексом БАВ *S. latissima* активность в отношении осмотической резистентности эритроцитов, в то время как комплекс БАВ ламинарии характеризовался более высокой активностью в отношении перекисной резистентности эритроцитов. Указанные особенности подчёркивают целесообразность совместного применения этих экстрактов. При трёхдневном совместном введении комплексов БАВ *F. vesiculosus* и *S. latissima* в дозах 60 и 15 мг/кг соответственно была определена высокая мембранопротекторная и антиоксидантная активность. Однако увеличение дозы или длительности введения снижает степень положительного влияния комплексов БАВ на стойкость эритроцитарных мембран.

Ключевые слова: эритроциты, гемолиз, мембранопротекторные свойства, антиоксидантная активность, биологически активные вещества, бурые водоросли

Финансирование: работа была проведена в рамках Государственного задания Федерального медико-биологического агентства № 388-00113-21-00 (код 64.003.21.800).

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Мельникова М.В., Шустов Е.Б., Кубарская Л.Г., Бельская А.В., Бондаренко А.А., Мелехова А.С., Подольская Е.П., Краснов К.А. Изучение влияния биологически активных веществ бурых водорослей на стойкость эритроцитарных мембран. *Биомедицина*. 2021;17(3E):151–155. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-151-155>

Поступила 19.04.2021

Принята после доработки 24.06.2021

Опубликована 20.10.2021

EFFECTS OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES FROM BROWN ALGAE ON THE RESISTANCE OF ERYTHROCYTE MEMBRANES

Margarita V. Melnikova*, Evgeniy B. Shustov, Larisa G. Kubarskaya, Alisa V. Belskaya,
Anastasiya A. Bondarenko, Aleksandra S. Melekhova, Ekaterina P. Podolskaya,
Konstantin A. Krasnov

Golikov Research Clinical Center of Toxicology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia
192019, Russian Federation, Saint Petersburg, Bekhtereva Str., 1

A study of different modes of administration of bioactive substances (BAS) of algae *F. vesiculosus* and *S. latissima* to laboratory animals allowed the authors to establish the doses and duration of administration,

at which the complexes under study show moderate cytoprotective activity (15 and 30 mg/kg for *S. latissima*, 60 and 120 mg/kg for *F. vesiculosus*; three-day administration). It was found that the complex of BAS *F. vesiculosus* is characterized by a higher activity with respect to erythrocyte osmotic resistance compared to the complex of BAS *S. latissima*. At the same time, the complex of BAS laminaria is characterized by a higher activity with respect to erythrocyte peroxide resistance. The above features emphasize the feasibility of combined use of these extracts. At three-day combined administration of complexes of BAS *F. vesiculosus* and *S. latissima* at doses of 60 and 15 mg/kg, respectively, their high membrane-protective and antioxidant activity was determined. However, a higher dose or longer administration of the BAS complexes negatively affects the resistance of erythrocyte membranes.

Keywords: erythrocyte, hemolysis, membrane-stabilizing action, antioxidative activity, bioactive substances, brown algae

Funding: this work was performed in the framework of State task of the Federal Medical and Biological Agency No. 388-00113-21-00 (number 64.003.21.800).

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Melnikova M.V., Shustov E.B., Kubarskaya L.G., Belskaya A.V., Bondarenko A.A., Melekhova A.S., Podolskaya E.P., Krasnov K.A. Effects of Biologically Active Substances from Brown Algae on the Resistance of Erythrocyte Membranes. *Journal Biomed.* 2021;17(3E):151–155. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-151-155>

Submitted 19.04.2021

Revised 24.06.2021

Published 20.10.2021

Введение

Биологическая активность многих соединений зависит от их способности влиять на регуляцию процессов перекисного окисления липидов, а также воздействовать на структурное состояние клеточных мембран. Модельной биологической системой исследования механизмов развития окислительных повреждений клеточных мембран являются эритроциты крови [2]. Эритроциты чувствительны к окислительным повреждениям вследствие значительного содержания полиненасыщенных жирных кислот в липидах мембран и наличия гемоглобина, являющегося потенциальным промотором окислительных процессов. В связи с этим для оценки мембранопротекторного действия исследуемых стандартизированных по содержанию маркерного каротиноида фукоксантина экстрактов бурых водорослей Белого моря были изучены показатели, характеризующие стойкость эритроцитарных мембран.

Материалы и методы

В работе были использованы белые беспородные крысы-самцы возрастом 3 мес. массой 200–220 г, источник получения — питомник «Рапполово», Ленинградская обл. Продолжительность карантина составила 14 дней. Животных содержали в стандартных условиях в соответствии с правилами, утверждёнными постановлением главного государственного санитарного врача РФ от 29.08.2014 № 51 об утверждении СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)». Протокол исследования был одобрен биоэтической комиссией ФГБУ НКЦТ им. С.Н. Голикова ФМБА России.

Выделение комплексов биологически активных веществ (БАВ) из водорослей *F. vesiculosus* и *S. latissima* осуществляли по оригинальной методике, разработанной в ФГБУ НКЦТ им. С.Н. Голикова

ФМБА России [3]. Исследуемые образцы комплексов БАВ водорослей вводили внутривенно с помощью зонда в течение 3 и 28 дней. Забор крови осуществлялся на 4-й и 29-й дни после начала введения. В исследовании использовались 3 уровня доз (половинная, однократная и пятикратная), рассчитанные исходя из процентного содержания фукоксантина в комплексах БАВ *F. vesiculosus* и *S. latissima*, 1 и 4% соответственно.

Перекисную и осмотическую резистентность эритроцитов определяли, модифицировав способ, описанный в работе [1]. Эритроциты двукратно отмывали в физ. р-ре, готовили 3 экспериментальные пробы. Для этого к 5% суспензии эритроцитов добавляли: 0,068% перекись водорода, дистиллированную воду с добавкой буфера, забуференный физ. р-р. На последнем этапе в каждую из проб добавляли 0,2% р-ра азида натрия. Затем пробы инкубировали 1 ч при температуре 37°C и центрифугировали 10 мин при 2000 g, надосадочную жидкость добавляли к трансформирующему раствору и определяли величину оптической плотности E_{541} спектрофотометрически.

Результаты и их обсуждение

Спонтанный гемолиз эритроцитов — это маркер их повреждения токсическими или иными неблагоприятными воздействиями на организм животного. Осмотическая резистентность эритроцитов обратно пропорциональна уровню гемолиза, вызванного инкубацией эритроцитов в дистиллированной воде с добавкой буфера. Показатель осмотической резистентности (ПОР) определяет интегральную устойчивость эритроцитарных мембран к повреждению, вызванному градиентом осмотически активных веществ, и может отражать активность энергопродуцирующих механизмов клетки.

В ходе работы установлено, что только экстракт фукуса в дозе 120 мг/кг повышал осмотическую резистентность эритроцитов,

что может отражать его влияние на энергозависимые механизмы ионного транспорта и проявлять мембранопротекторное действие. Более низкие дозы комплексов БАВ не оказывали статистически достоверного положительного влияния на этот показатель. Длительное введение обоих экстрактов в пятикратной дозе снижало осмотическую резистентность эритроцитов.

Перекисная резистентность эритроцитов (ПРЭ) на организменном уровне может отражать устойчивость к окислительному стрессу. Её уровень определяется балансом проокислительных и антиокислительных факторов, воздействующих на мембраны эритроцитов, соотношением насыщенных и ненасыщенных жирных кислот в фосфолипидном бислое мембран, количеством макроэргических фосфатных связей, поддерживающих заряд клеточной мембраны и доступность мест свободнорадикального окисления липидов к воздействию активных форм кислорода.

Комплекс БАВ ламинарии содержит в своём составе липотропные компоненты, способные встраиваться в фосфолипидный бислой мембран эритроцитов и повышать её устойчивость к перекисному окислению, что проявляется повышением ПРЭ в дозе 15 мг/кг при трёхдневном введении. Длительное введение в пятикратной дозе снижало ПРЭ практически в 2 раза для обоих экстрактов.

Интегральный показатель — стойкость мембран эритроцитов (СМЭ) — объединяет влияние на два показателя (осмотическую и перекисную резистентность), корреляционный анализ выявляет наличие взаимодействия только с перекисной резистентностью ($r=0,44$), что отражает несколько больший вклад этого показателя. Корреляционные связи между осмотической резистентностью и перекисной отсутствуют ($r=-0,16$), что требует анализировать эти показатели как независимые (самостоятельные).

Выводы

Комплекс БАВ *F. vesiculosus* в дозе 120 мг/кг способен повышать осмотическую резистентность эритроцитов, что может отражать его влияние на уровень АТФ-зависимых процессов поддержания градиентов осмотически активных веществ в живой клетке. Комплекс БАВ *S. latissima* в дозе 15 мг/кг при курсовом введении способен повышать уровень перекисной резистентности эритроцитов, что отражает спо-

собность его компонентов накапливаться в клеточных мембранах и препятствовать в них активному протеканию процессов свободнорадикального окисления липидов, ведущих к нарушениям целостной структуры и функции эритроцитарных мембран. Определена высокая мембранопротекторная и антиоксидантная активность при совместном введении в течение 3 дней комплексов БАВ *F. vesiculosus* и *S. latissima* в дозах 60 и 15 мг/кг соответственно.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Михайлов С.С., Романчук Л.А., Фактор Э.А. *Способ определения перекисной резистентности эритроцитов*. Патент РФ 2134420 С1, МПК G 01 N 33/50. 1997. [Mikhaylov S.S., Romanchuk L.A., Faktor E.A. *Sposob opredeleniya perekisnoy rezistentnosti eritrotsitov* [Method for determination of erythrocyte peroxide resistance]. Patent RF 2134420 S1, МПК G 01 N 33/50. 1997. (In Russian)].
2. Подосиновикова Н.П., Краснов К.А., Бондаренко А.А., Александрова М.Л., Зайцева М.А., Халаман В.В. Изучение токсичности и безопасности липофильных экстрактов беломорских бурых водорослей — фукуса пузырчатого и ламинарии сахаристой на модели *Daphnia magna Straus*. *Токсикологический вестник*. 2020;4:49–55. [Podosinikovaya N.P., Krasnov K.A., Bondarenko A.A., Alexandrova M.L., Zaytseva M.A., Khalaman V.V. *Izucheniye toksichnosti i bezopasnosti lipofil'nykh ekstraktov belomorskikh burykh vodorosley — fukusa puzырчатого i laminarii sakharistoy* na modeli *Daphnia magna Straus* [Studying the toxicity and safety of the lipophilic extracts of belomorian brown algae — fucus vesiculosus and saccharina latissima on the *Daphnia magna Straus* model]. *Toksikologicheskiy vestnik* [Toxicology Bulletin]. 2020;4:49–55. (In Russian)].
3. Шевченко О.Г., Шишкина Л.Н. Анализ метода окислительного гемолиза эритроцитов крови для оценки антиоксидантной и мембранопротекторной активности природных и синтетических соединений. *Успехи современной биологии*. 2014;134(2):133–148. [Shevchenko O.G., Shishkina L.N. *Analiz metoda oksislitel'nogo gemoliza eritrotsitov krovi dlya otsenki antioksidantnoy i membranoprotekturnoy aktivnosti prirodnykh i sinteticheskikh soedineniy* [Analysis of a method for oxidative hemolysis of blood erythrocytes to assess the antioxidant and membrane-protective activities of natural and synthetic compounds]. *Uspekhi sovremennoy biologii* [Advances in modern biology]. 2014;134(2):133–148. (In Russian)].

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Мельникова Маргарита Викторовна*, ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова ФМБА России»;
e-mail: margarita10108@mail.ru

Шустов Евгений Борисович, д.м.н., проф., ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова ФМБА России»;
e-mail: shustov-msk@mail.ru

Кубарская Лариса Георгиевна, к.б.н., ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова ФМБА России»;
e-mail: larkub@yandex.ru

Margarita V. Melnikova*, Golikov Research Clinical Center of Toxicology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: margarita10108@mail.ru

Evgeniy B. Shustov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Golikov Research Clinical Center of Toxicology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: shustov-msk@mail.ru

Larisa G. Kubarskaya, Cand. Sci. (Biol.), Golikov Research Clinical Center of Toxicology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: larkub@yandex.ru

Бельская Алиса Владимировна, ФГБУ
«Научно-клинический центр токсикологии
имени академика С.Н. Голикова ФМБА России»;
e-mail: belskayaalisa@gmail.com

Бондаренко Анастасия Александровна, ФГБУ
«Научно-клинический центр токсикологии
имени академика С.Н. Голикова ФМБА России»;
e-mail: bondarenko-nastua@yandex.ru

Мелехова Александра Сергеевна, ФГБУ
«Научно-клинический центр токсикологии
имени академика С.Н. Голикова ФМБА России»;
e-mail: melehovaalexandra@gmail.com

Подольская Екатерина Петровна, к.х.н.,
ФГБУ «Научно-клинический центр токсико-
логии имени академика С.Н. Голикова ФМБА
России»;
e-mail: ek.podolskaya@gmail.com

Краснов Константин Андреевич, к.х.н., ФГБУ
«Научно-клинический центр токсикологии име-
ни академика С.Н. Голикова ФМБА России»;
e-mail: krasnov_tox@mail.ru

Alisa V. Belskaya, Golikov Research Clinical
Center of Toxicology of the Federal Medical and
Biological Agency of Russia;
e-mail: belskayaalisa@gmail.com

Anastasiya A. Bondarenko, Golikov Research
Clinical Center of Toxicology of the Federal
Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: bondarenko-nastua@yandex.ru

Aleksandra S. Melekhova, Golikov Research
Clinical Center of Toxicology of the Federal
Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: melehovaalexandra@gmail.com

Ekaterina P. Podolskaya, Cand. Sci. (Chem.),
Golikov Research Clinical Center of Toxicology
of the Federal Medical and Biological Agency
of Russia;
e-mail: ek.podolskaya@gmail.com

Konstantin A. Krasnov, Cand. Sci. (Chem.),
Golikov Research Clinical Center of Toxicology
of the Federal Medical and Biological Agency
of Russia;
e-mail: krasnov_tox@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author



ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ФАРМАКОКИНЕТИКА ЛЕКАРСТВЕННОГО СОЕДИНЕНИЯ ГЗК-111, ОБЛАДАЮЩЕГО НЕЙРОПРОТЕКТОРНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

А.Л. Подолько, П.О. Бочков*, Р.В. Шевченко, А.А. Литвин,
Г.Б. Колыванов, В.П. Жердев

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова»
125315, Российская Федерация, Москва, ул. Балтийская, 8

Изучена фармакокинетика лекарственного соединения, обладающего нейропротекторной активностью, — этилового эфира N-фенилацетил-глицил-L-пролина и его метаболита цикло-L-пролилглицина в плазме крови крыс после однократного внутривенного введения в дозе 20 мг/кг. Установлено, что метаболит вдвое дольше циркулирует в системном кровотоке животных по сравнению с этиловым эфиром N-фенилацетил-глицил-L-пролина, а его концентрации в плазме крови были в 50–70 раз выше концентраций исходного соединения.

Ключевые слова: нейропротекторное лекарственное соединение, этиловый эфир N-фенилацетил-глицил-L-пролина, цикло-L-пролилглицин

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Подолько А.Л., Бочков П.О., Шевченко Р.В., Литвин А.А., Колыванов Г.Б., Жердев В.П. Экспериментальная фармакокинетика лекарственного соединения ГЗК-111, обладающего нейропротекторной активностью. *Биомедицина*. 2021;17(3E):156–160. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-156-160>

Поступила 15.04.2021

Принята после доработки 24.06.2021

Опубликована 20.10.2021

EXPERIMENTAL PHARMACOKINETICS OF THE GZK-111 DRUG PREPARATION EXHIBITING NEUROPROTECTIVE ACTIVITY

Anna L. Podolko, Pavel O. Bochkov*, Roman V. Shevchenko, Alexander A. Litvin,
Gennadiy B. Kolyvanov, Vladimir P. Zherdev

Zakusov Institute of Pharmacology
125315, Russian Federation, Moscow, Baltiyskaya Str., 8

We studied the pharmacokinetics of a drug preparation, ethyl ester of N-phenylacetyl-glycyl-L-proline, exhibiting neuroprotective activity and its metabolite cyclo-L-prolylglycine in rat blood plasma after a single intravenous administration at a dose of 20 mg/kg. The metabolite was found to circulate in the systemic bloodstream of animals twice as long as the ethyl ester of N-phenylacetyl-glycyl-L-proline, with its plasma concentrations being 50–70 times higher than those of the parent compound.

Keywords: neuroprotective drug compound, ethyl ester of N-phenylacetyl-glycyl-L-proline, cyclo-L-prolylglycine

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Podolko A.L., Bochkov P.O., Shevchenko R.V., Litvin A.A., Kolyvanov G.B., Zherdev V.P. Experimental Pharmacokinetics of the GZK-111 Drug Preparation Exhibiting Neuroprotective Activity. *Journal Biomed*. 2021;17(3E):156–160. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-156-160>

Submitted 15.04.2021
Revised 24.06.2021
Published 20.10.2021

Введение

Перспективными нейропротекторами, обладающими низкой иммуногенностью и высокой физиологической активностью, являются пептиды [2]. Исходя из структуры их разделяют на две группы: полипептидные комплексы, выделенные из мозга крупного рогатого скота или свиней, и короткие синтетические пептиды [5]. Класс коротких синтетических пептидов представляет особый интерес благодаря отсутствию побочных эффектов и токсичности, а также низкой дозировке действующего вещества по сравнению с олигопептидами [3, 6].

В ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» синтезируются и исследуются различные аналоги природных нейропептидов. Так, например, сконструирован линейный, замещённый этиловый эфир N-фенилацетил-глицил-L-пролина (ГЗК-111), строение которого предполагает возможность превращения его в биологических средах в цикло-L-пролилглицин (ЦПГ). В опытах *in vitro* показано, что ГЗК-111 в плазме крови крыс превращается в ЦПГ и проявляет весь спектр фармакологической активности, характерный для последнего [1, 2, 4].

Целью работы являлось изучение экспериментальной фармакокинетики нового оригинального соединения ГЗК-111, обладающего

дающего нейропротекторной активностью, а также его метаболита ЦПГ после однократного внутривенного введения в экспериментах на крысах.

Материалы и методы

В работе использовали субстанции, синтезированные в ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова»: этиловый эфир N-фенилацетил-глицил-L-пролина (рис. 1а) и цикло-L-пролилглицин (рис. 1б).

Исследование проведено на половозрелых беспородных крысах-самцах массой тела 180–220 г. Животные содержались в лабораторном виварии при 20–22°C, относительной влажности воздуха 45–65%, имели постоянный доступ к корму и воде. Эксперименты проводили в соответствии с решением Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 81 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств».

Изучение фармакокинетики ГЗК-111 в плазме крови крыс проводили после внутривенного (в/в) введения раствора фармацевтической субстанции в дозе 20 мг/кг в воде дистиллированной с добавлением 1 капли твина-80. Содержание ГЗК-111 и ЦПГ определяли в плазме крови до введения исследуемого вещества (контроль) и через 0,08; 0,25;

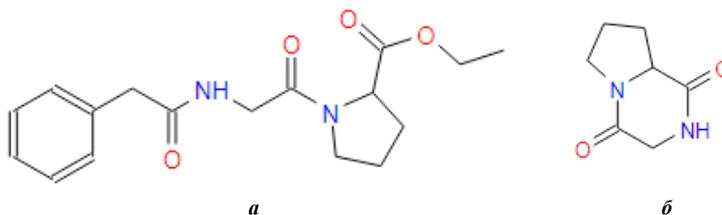


Рис. 1. Структурная формула ГЗК-111 (а) и ЦПГ (б).
Fig. 1. Skeletal formula of GZK-111 (a) and CPG (b).

0,5; 1; 2; 3 и 4 ч после введения. Образцы крови крыс получали после декапитации животных. На каждую дискретную точку приходилось по 5 животных.

Количественное определение соединений ЦПГ и ГЗК-111 в плазме крови проводили с использованием совмещённой системы высокоэффективного жидкостного хроматографа Ultimate 3000 («Thermo Scientific», США), с масс-селективным детектором типа тройной квадруполь модели TSQ Altis («Thermo Scientific», США).

Результаты и их обсуждение

Фармакокинетические кривые ГЗК-111 и ЦПГ в плазме крови крыс после однократного в/в введения ГЗК-111 в дозе 20 мг/кг представлены на рис. 2. Поскольку на каждую временную точку приходилось по 5 животных, результирующая кривая построена по усреднённым концентрациям. Следует отметить, что в анализируемых пробах исследуемое вещество определялось в крайне незначительных количествах. Из рисунка видно, что ГЗК-111 быстро вы-

водится из плазмы крови животных и к 2 ч после начала эксперимента только у одного животного из пяти удалось достоверно измерить концентрацию нейропротектора.

Учитывая, что по своей структуре ГЗК-111 относится к группе коротких пептидов, можно предположить, что это вещество должно подвергаться интенсивной биотрансформации. Однако период полуэлиминации ($t_{1/2el}$) неизменённого вещества составил 0,7 ч, поэтому ГЗК-111 можно отнести к группе «долгоживущих» дипептидных веществ. Такие фармакокинетические параметры, как $t_{1/2el}$ и среднее время удерживания вещества в организме (MRT — 0,8 ч), указывают на достаточно долгое нахождение исследуемого вещества в системном кровотоке животных. Кажущаяся максимальная концентрация (C_0) в плазме крови составила 0,26 нг/мл.

При проведении хромато-масс-спектрометрического анализа в образцах плазмы крови крыс обнаружено вещество, соответствующее предполагаемому метаболиту цикло-L-пролилглицину с отношением

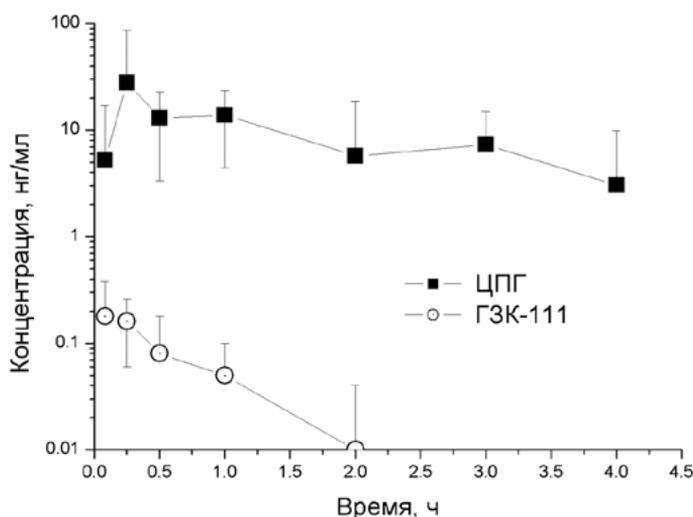


Рис. 2. Усреднённые фармакокинетические кривые ГЗК-111 и ЦПГ в плазме крови крыс после однократного внутривенного введения в дозе 20 мг/кг.

Fig. 2. Average pharmacokinetic curves of GZK-111 and CPH in rat blood plasma after a single intravenous injection at a dose of 20 mg/kg.

массы к заряду $m/z=155$. Из рис. 2 видно, что ЦПГ детектировался на всём протяжении эксперимента, и его концентрации в плазме крови были в 50–70 раз выше концентраций исходного соединения. Метаболит достигает максимальных значений через 0,25 ч после введения ГЗК-111. При этом максимальная концентрация в плазме крови составила 27,93 нг/мл. Величина $t_{1/2}$ метаболита составила 1,4 ч, что в два раза больше, чем для неизменённого соединения. Подтверждением более длительного пребывания ЦПГ в системном кровотоке и, следовательно, в органе-ми-

шени является значение MRT метаболита, равное 2,1 ч.

Выводы

Изучена фармакокинетика нового, оригинального нейропротекторного лекарственного соединения ГЗК-111 и его метаболита ЦПГ в плазме крови крыс после однократного внутривенного введения в дозе 20 мг/кг. Определены основные фармакокинетические параметры. Установлено, что метаболит определяется в значительно больших количествах и вдвое дольше циркулирует в системном кровотоке животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Антипова Т.А., Колясникова К.Н., Волкова Ю.С., Антипов П.И., Кузнецова Е.А., Николаев С.В. Нейропротекторные свойства *in vitro* новых замещённых глипролинов. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2018;3:31–36. [Antipova T.A., Kolyasnikova K.N., Volkova Yu.S., Antipov P.I., Kuznetsova E.A., Nikolaev S.V. Neuroprotectornye svoystva *in vitro* novykh zameshchennykh gliprolinov [Neuroprotective properties of novel substituted glyprolines *in vitro*]. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. 2018;3:31–36. (In Russian)]. DOI: 10.24411/2587-7836-2018-10021.
2. Гудашева Т.А., Колясникова К.Н., Кузнецова Е.А. и др. Этиловый эфир *N*-фенилацетил-глицил-*L*-пролина метаболизируется до цикло-*L*-пролилглицина, проявляя сходный спектр нейрорепродуктивной активности. *Химико-фармацевтический журнал*. 2017;50(11):705–710. [Gudasheva T.A., Kolyasnikova K.N., Kuznetsova E.A., et al. Etilovyy efir *N*-fenilatsetil-glicil-*L*-prolina metaboliziruetsya do tsiklo-*L*-prolylglicina, proyavlyaya skhodnyy spektr neyropsikhotropnoy aktivnosti [N-phenylacetyl-glycyl-*L*-proline ethyl ester converts into cyclo-*L*-prolylglycine showing a similar spectrum of neuropsychotropic activity]. *Chemistry and Pharmaceutical Journal*. 2017;50(11):705–710. (In Russian)]. DOI: 10.1007/s11094-017-1516-4
3. Жуйкова С.Е. Глипролины — регуляторные пептиды с интегративным действием. *Интегративная физиология*. 2020;1(4):303–316. [Zhuikova S.E. Gliproliny — regulatorynye peptidy s integrativnym deystviem [Glyprolines: Regulatory peptides with an integrative action]. *Integrative Physiology*. 2020;1(4):303–316. (In Russian)]. DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-4-303-316.
4. Николаев С.В., Логвинов И.О., Колясникова К.Н., Кузнецова Е.А., Антипов П.И., Антипова Т.А. Нейропротекторные свойства *in vitro* новых глипролинов, замещённых по *N*-концу. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2020;2:4–10. [Nikolaev S.V., Logvinov I.O., Kolyasnikova K.N., Kuznetsova E.A., Antipov P.I., Antipova T.A. Neuroprotectornye svoystva *in vitro* novykh gliprolinov, zameshchennykh po *N*-kontsu [In vitro neuroprotective activity of analogues of N-terminus substituted glyprolines]. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. 2020;2:4–10. (In Russian)]. DOI: 10.37489/2587-7836-2020-2-4-10.
5. Хавинсон В.Х. Лекарственные пептидные препараты: прошлое, настоящее, будущее. *Клиническая медицина*. 2020;98(3):165–177. [Khavinson V.Kh. Lekarstvennyye peptidnyye preparaty: proshloe, nastoyashee, budushchee [Peptide medicines: Past, present, future]. *Clinical Medicine*. 2020;98(3):165–177. (In Russian)]. DOI: 10.30629/0023-2149-2020-98-3-165-177.
6. Apostolopoulos V., Bojarska J., Chai T.-T. A global review on short peptides. *Frontiers and Perspectives Molecules*. 2021;26:430. DOI: 10.3390/molecules26020430.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Подолько Анна Леонидовна, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова»;

e-mail: podolko.a.l@gmail.com

Бочков Павел Олегович*, к.б.н., ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова»;

e-mail: bok-of@yandex.ru

Шевченко Роман Владимирович, к.м.н., ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова»;

e-mail: rnm.shev@gmail.com

Литвин Александр Алексеевич, д.б.н., ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова»;

e-mail: litbiopharm@yandex.ru

Кольванов Геннадий Борисович, д.б.н., ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова»;

e-mail: 7822535@mail.ru

Жердев Владимир Павлович, д.м.н., проф., ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова»;

e-mail: zherdevpharm@mail.ru

Anna L. Podolko, Zakusov Institute of Pharmacology;

e-mail: podolko.a.l@gmail.com

Pavel O. Bochkov*, Cand. Sci. (Biol.), Zakusov Institute of Pharmacology;

e-mail: bok-of@yandex.ru

Roman V. Shevchenko, Cand. Sci. (Med.), Zakusov Institute of Pharmacology;

e-mail: rnm.shev@gmail.com

Alexander A. Litvin, Dr. Sci. (Biol.), Zakusov Institute of Pharmacology;

e-mail: litbiopharm@yandex.ru

Gennadiy B. Kolyvanov, Dr. Sci. (Biol.), Zakusov Institute of Pharmacology;

e-mail: 7822535@mail.ru

Vladimir P. Zherdev, Dr. Sci. (Med.), Prof., Zakusov Institute of Pharmacology;

e-mail: zherdevpharm@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

<https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-161-164>



СЕДАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ НОВОГО ПРОИЗВОДНОГО АЛЛИЛМОРФОЛИНА У *DANIO RERIO* В ТЕСТЕ «НОВЫЙ АКВАРИУМ»

В.А. Приходько^{1*}, Ю.И. Сысоев^{1,2}

¹ ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Минздрава России
197376, Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 14, лит. А

² ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»
199034, Российская Федерация, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7–9

Проведена оценка влияния нового хромонсодержащего производного аллилморфолина (*E*)-4-[1-(8-бром-6-метил-4-оксо-4*H*-хромен-3-ил)-4-метилпент-1-ен-3-ил]морфолин-4-ия хлорида на поведение рыб *Danio rerio* в тесте «Новый аквариум». На основании наблюдаемых изменений в поведении рыб установлено наличие у исследуемого соединения седативной активности.

Ключевые слова: производные аллилморфолина, *Danio rerio*, поведенческие тесты, новый аквариум, седативные средства

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Приходько В.А., Сысоев Ю.И. Седативная активность нового производного аллилморфолина у *Danio rerio* в тесте «Новый аквариум». *Биомедицина*. 2021;17(3E):161–164. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-161-164>

Поступила 10.05.2021

Принята после доработки 08.06.2021

Опубликована 20.10.2021

EDATIVE ACTIVITY OF A NEW ALLYLMORPHOLINE DERIVATIVE IN THE NOVEL TANK DIVING TEST IN ZEBRAFISH *DANIO RERIO*

Veronika A. Prikhodko^{1*}, Yuriy I. Sysoev^{1,2}

¹ St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health Care of Russia
197376, Russian Federation, St. Petersburg, Professora Popova Str., 14, let. A

² St. Petersburg State University
199034, Russian Federation, St. Petersburg, Universitetskaya Embankment, 7–9

A new chromone-containing allylmorpholine derivative, (*E*)-4-[1-(8-bromo-6-methyl-4-oxo-4*H*-chromen-3-yl)-4-methylpent-1-en-3-yl]morpholin-4-ium chloride, was screened for behavioral effects in zebrafish *Danio rerio* using the novel tank diving test. Based on the observed alterations in behavior, the compound was confirmed to exert a sedative effect in zebrafish.

Keywords: allylmorpholines, zebrafish, *Danio rerio*, behavioral testing, novel tank test, sedatives

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Prikhodko V.A., Sysoev Y.I. Edative Activity of a New Allylmorpholine Derivative in the Novel Tank Diving Test in Zebrafish *Danio Rerio*. *Journal Biomed*. 2021;17(3E):161–164. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-161-164>

Submitted 10.05.2021

Revised 08.06.2021

Published 20.10.2021

Введение

Антихолинэстеразные средства и антагонисты рецепторов N-метил-D-аспартата (NMDA) являются широко используемыми в неврологической практике препаратами. Для ряда хромонсодержащих производных аллилморфолина (ПАМ) *in vitro* показана блокирующая активность в отношении ферментов ацетилхолинэстеразы и бутирилхолинэстеразы, а также NMDA-рецепторов [1]. В связи с этим ПАМ представляют интерес в качестве потенциальных нейропротекторных средств, однако особенности их фармакологической активности требуют дальнейшего изучения *in vivo*.

Целью исследования стала оценка влияния нового ПАМ (E)-4-[1-(8-бром-6-метил-4-оксо-4H-хромен-3-ил)-4-метилпент-1-ен-3-ил]морфолин-4-ия хлорида на поведение рыб *Danio rerio* в тесте «Новый аквариум».

Материалы и методы

Исследование выполнено на 64 взрослых нелинейных рыбах *Danio rerio* в возрасте 5–7 мес., соотношение полов — 1:1, рандомизированных на 4 группы по 16 особей.

Оценку активности исследуемого соединения проводили при помощи теста «Новый аквариум» по описанной ранее методике [3]. Непосредственно перед тестированием каждую рыбу помещали на 20 мин в пластиковый контейнер, заполненный до объёма 0,5 л водой (контрольная группа) либо раствором испытуемого вещества с концентрацией 1, 10 или 100 мг/л (опытные группы 1, 2 и 3 соответственно).

Запись движения рыб в новом аквариуме вели в течение 5 мин при помощи видеокамеры («Сапун», КНР). Анализ полученных видеозаписей проводили с использова-

нием программы EthoVision XT 11 («Noldus Information Technology», Нидерланды). Для каждой рыбы оценивали проплытую дистанцию (см); среднюю и максимальную скорость движения (см/с); время, проведённое в неподвижном состоянии (с); время, проведённое в верхней части аквариума (с); число переходов из нижней части аквариума в верхнюю и латентность первого такого перехода (с) [2].

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы GraphPad Prism 8.0 («GraphPad», США). Числовые данные, приведённые на графиках, представлены в виде средних арифметических; планки погрешностей отражают стандартные ошибки средних.

Результаты исследований

Исследуемое ПАМ (рис. 1) в концентрациях 10 и 100 мг/л значительно уменьшало проплытую рыбами дистанцию и среднюю скорость передвижения ($p < 0,01$ во всех случаях). При этом выраженность эффекта, полученного при использовании концентрации 100 мг/л, превышала таковую для концентрации 10 мг/л ($p < 0,01$). В высшей использованной концентрации исследуемое ПАМ также значительно снижало максимальную скорость движения рыб и время, проведённое ими в неподвижном состоянии ($p < 0,05$ в обоих случаях) (рис. 2).

Выводы

Хромонсодержащее производное аллилморфолина (E)-4-[1-(8-бром-6-метил-4-оксо-4H-хромен-3-ил)-4-метилпент-1-ен-3-ил]морфолин-4-ия хлорид обладает седативной активностью у рыб *Danio rerio* в тесте «Новый аквариум».

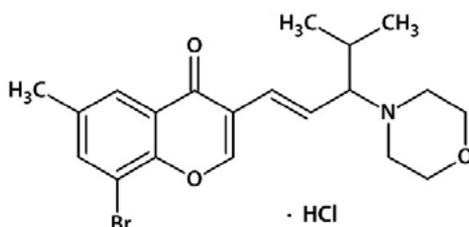


Рис. 1. Структурная формула исследуемого производного аллилморфолина.
Fig. 1. Structural formula of the studied allylmorpholine derivative.

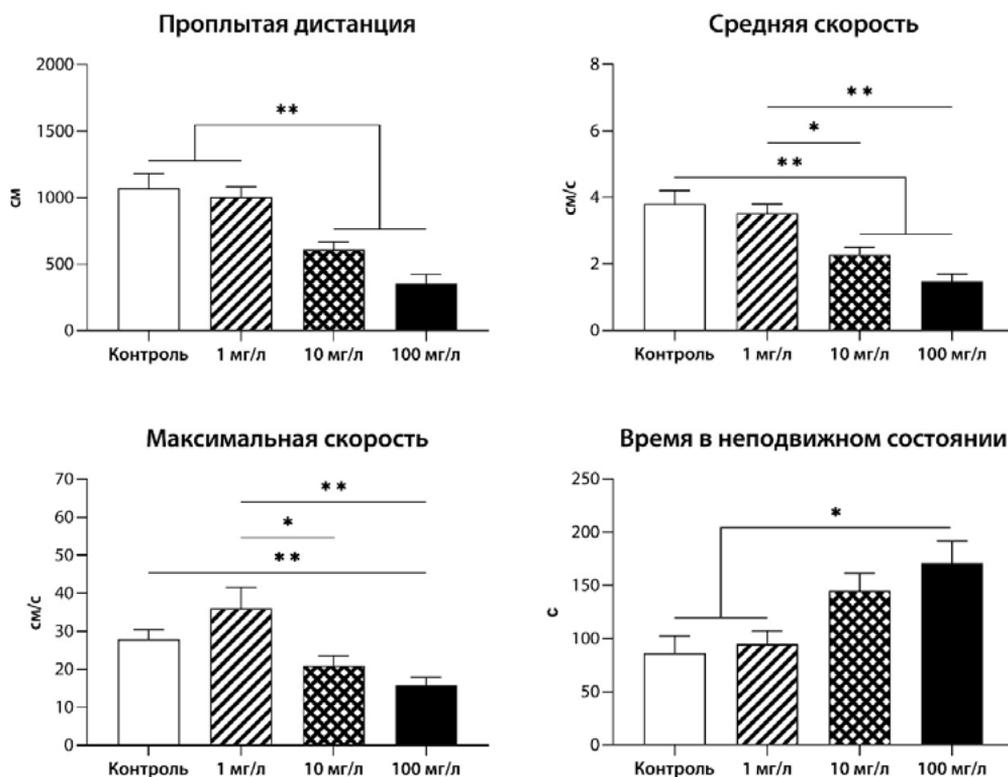


Рис. 2. Влияние исследуемого соединения на поведение *Danio rerio*; * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$.
Fig. 2. Effects of the studied compound on zebrafish behavior; * — $p < 0.05$; ** — $p < 0.01$.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Chernov N.M., Shutov R.V., Barygin O.I., et al. Synthesis of chromone-containing allylmorpholines through a Morita-Baylis-Hillman-type reaction. *Eur. J. Org. Chem.* 2018;2018(45):6304–6313. DOI: 10.1002/ejoc.201801159.
2. Demin K.A., Kolesnikova T.O., Khatsko S.L., et al. Acute effects of amitriptyline on adult zebrafish: Potential relevance to antidepressant drug screening and modeling human toxidromes. *Neurotoxicol. Teratol.* 2017;62:27–33. DOI: 10.1016/j.ntt.2017.04.002.
3. Egan R.J., Bergner C.L., Hart P.C., et al. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behav. Brain Res.* 2009;205(1):38–44. DOI: 10.1016/j.bbr.2009.06.022.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Приходько Вероника Александровна*, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России;

e-mail: veronika.prihodko@pharminnotech.com

Сусоев Юрий Игоревич, к.б.н., ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России; ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»;

e-mail: susoev92@mail.ru

Veronika A. Prihodko*, St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health Care of Russia;

e-mail: veronika.prihodko@pharminnotech.com

Yuriy I. Sysoev, Cand. Sci. (Biol.), St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health Care of Russia; St. Petersburg State University;

e-mail: susoev92@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

<https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-165-169>



СУКЦИНАТСОДЕРЖАЩИЕ ПРЕПАРАТЫ В КОРРЕКЦИИ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ НАРУШЕНИЙ ПЕЧЕНИ И МЕТАБОЛИЗМА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ЦИРРОЗЕ

Н.С. Тропская^{1,2,*}, Ю.В. Гурман¹, Е.А. Кислякова¹, И.Г. Вилкова¹, Е.В. Клычникова¹,
В.Н. Байматов³, Т.С. Попова¹

¹ ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗМ»
129090, Российская Федерация, Москва, Большая Сухаревская пл., 3

² ФГБОУ ВО «Московский авиационный институт
(национальный исследовательский университет)»
125993, Российская Федерация, Москва, Волоколамское ш., 4

³ ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии —
МВА им. К.И. Скрябина»
109472, Российская Федерация, Москва, ул. Академика Скрябина, 23

В экспериментах на 55 крысах оценено влияние янтарной кислоты на морфофункциональное состояние печени и метаболизма при экспериментальном циррозе печени, вызванном длительным введением (в течение трёх недель) ацетаминофена в сочетании с высокожировой диетой.

Ежедневное введение янтарной кислоты в дозе 50 мг/кг на протяжении 2 недель приводило к разрешению холестатического синдрома, восстановлению показателей пигментного обмена, а также нормализации цитоархитектоники печени.

Таким образом, янтарная кислота как основа сукцинатсодержащих препаратов является эффективным гепатопротектором в метаболическом лечении цирроза печени.

Ключевые слова: сукцинатсодержащие препараты, метаболизм, цирроз печени

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Тропская Н.С., Гурман Ю.В., Кислякова Е.А., Вилкова И.Г., Клычникова Е.В., Байматов В.Н., Попова Т.С. Сукцинатсодержащие препараты в коррекции морфофункциональных нарушений печени и метаболизма при экспериментальном циррозе. *Биомедицина*. 2021;17(3E):165–169. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-165-169>

Поступила 17.05.2021

Принята после доработки 28.06.2021

Опубликована 20.10.2021

SUCCINATE-CONTAINING DRUGS IN THE CORRECTION OF MORPHOFUNCTIONAL DISORDERS OF THE LIVER AND METABOLISM IN EXPERIMENTAL CIRRHOSIS

Nataliya S. Tropkaya^{1,2,*}, Yulia V. Gurman¹, Ekaterina A Kislyakova¹, Irina G. Vilkova¹,
Elena V. Klychnikova¹, Valeriy N. Baymatov³, Tamara S. Popova¹

¹ N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine of the Moscow Health Care Department
129090, Russian Federation, Moscow, Bolshaya Sukharevskaya Square, 3

² Moscow Aviation Institute (National Research University)
125993, Russian Federation, Moscow, Volokolamskoe Highway, 4

³ *Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology named after K.I. Scryabin
109472, Russian Federation, Moscow, Akademika Scryabina Str., 23*

In experiments on 55 rats, the effect of the administration of succinic acid on the morpho-functional state of the liver and metabolism in experimental liver cirrhosis caused by prolonged administration (within 3 weeks) of acetaminophen in combination with a high-fat diet was evaluated. Daily administration of succinic acid at a dose of 50 mg/kg for 2 weeks led to the disappearance of cholestatic syndrome, restoration of pigment metabolism parameters, and normalization of liver cytoarchitectonics. Thus, succinic acid as a basis for succinate-containing drugs is an effective hepatoprotector in the metabolic treatment of liver cirrhosis.

Keywords: succinate-containing drugs, metabolism, liver cirrhosis

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Tropaskaya N.S., Gurman Y.V., Kislyakova E.A., Vilkova I.G., Klychnikova E.V., Baymatov V.N., Popova T.S. Succinate-Containing Drugs in the Correction of Morphofunctional Disorders of the Liver and Metabolism in Experimental Cirrhosis. *Journal Biomed.* 2021;17(3E): 165–169. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-165-169>

Submitted 17.05.2021

Revised 28.06.2021

Published 20.10.2021

Введение

В последнее десятилетие усилился интерес врачей и исследователей к группе антигипоксантов/антиоксидантов, которые используются с целью коррекции патогенетически значимых нарушений метаболизма гепатоцитов при поражениях печени различного генеза. Общим для сукцинатсодержащих гепатопротекторов является присутствие янтарной кислоты (ЯК) как промежуточного продукта цикла Кребса. В физиологических условиях ЯК диссоциирована, поэтому название её аниона — «сукцинат» — часто применяют как синоним термина «янтарная кислота». ЯК является универсальным промежуточным метаболитом, окисляется сукцинатдегидрогеназой, что приводит к ресинтезу АТФ, который необходим для нормального функционирования клеток [3]. Главные преимущества ЯК перед другими метаболическими субстратами особенно значимыми становятся в условиях гипоксии, на начальных этапах которой продукция эндогенного субстрата и скорость его окисления возрастают. При декомпенсации эндогенной продукции ЯК наступает активация анаэробного гликолиза. В этот момент

и до наступления необратимых биохимических повреждений восстановление процессов энергообмена начинает зависеть от экзогенно поступающей ЯК [1].

Целью работы явилось изучение влияния экзогенной ЯК на морфофункциональные изменения печени и метаболизма при экспериментальном циррозе.

Материалы и методы

Исследования выполнены на 55 крысах-самцах популяции линий Вистар массой тела 400–450 г в возрасте 12 мес. Протокол исследования был одобрен локальным комитетом по биомедицинской этике НИИ СП им. Н.В. Склифосовского.

Крысы адаптировались в течение 1 мес. в виварии. Все животные содержались в лаборатории в контролируемых условиях окружающей среды при температуре 20–24°C и влажности 45–65%, режим освещённости: с 8⁰⁰ до 20⁰⁰ — свет, с 20⁰⁰ до 8⁰⁰ — сумеречное освещение.

В качестве стандартной диеты использовали изокалорическую смесь для энтерального питания «Нутризон», содержащую 16% белка, 49% углеводов

и 35% жиров. Моделирование цирроза печени (ЦП) осуществляли введением ацетаминофена на фоне высокожировой диеты [2]. Ацетаминофен вводился животным в течение 21-го дня внутрижелудочно перед утренним кормлением в суточной дозе 500 мг/кг. К стандартной диете было добавлено кукурузное масло в дозе 2,1 мл/сут., что соответствовало дополнению к основному рациону 40% жира от общей суточной калорийности. Кукурузное масло вводили внутрижелудочно через 3 ч после введения ацетаминофена.

Было проведено две серии экспериментов. В 1-й серии изучали биохимические маркеры функционального состояния печени и метаболизма при экспериментальном ЦП. Исследовано две группы животных. В первой группе (интактная, n=14) животных в течение 21-го дня кормили стандартной диетой. Во второй группе (модель ЦП, n=8) животных кормили в течение 21-го дня стандартной диетой, а также вводили ацетаминофен в сочетании с кукурузным маслом. По окончании экспериментов производили взятие крови и образцов материала из левой боковой доли печени. Во 2-й серии оценивалось влияние введения ЯК на эффективность коррекции морфофункциональных и метаболических нарушений при экспериментальном ЦП. Исследовано две группы животных. В первой группе (контрольная — «самовосстановление», n=11) животных в течение 21-го дня кормили стандартной диетой, а также вводили ацетаминофен в сочетании с кукурузным маслом. Затем, в течение последующих 14-ти дней, животных переводили на стандартную диету. Во второй группе (опытная — коррекция ЯК, n=12) животных в течение 21-го дня кормили стандартной диетой, а также вводили ацетаминофен в сочетании с кукурузным маслом. Затем в течение последующих 14-ти дней переводили на стандартную диету с ежедневным

пероральным введением ЯК в дозе 50 мг/кг. По окончании экспериментов у животных забирали пробы крови и образцы материала из левой боковой доли печени.

Определение биохимических маркеров функционального состояния печени и метаболизма осуществлялось на биохимическом анализаторе Olympus AU2700 («Beckman Coulter», США). Для гистологического анализа материал фиксировали 12% нейтральным формалином, парафиновые срезы толщиной 7 мкм, а окрашивание проводили гематоксилин-эозином и трихром Маллори. Срезы просматривали на микроскопе Биомед-2 с применением цифровой фотокамеры с архивацией изображений.

Статистическая обработка данных проводилась с помощью программы Statistica 6.0. В связи с тем, что значения показателей во всех группах не имели нормального характера распределения, данные представляли как медиану и перцентили — Me (25;75) %. Для оценки различий между независимыми группами по уровню количественного признака использовали критерий Манна — Уитни. Статистически значимыми считались значения с $p < 0,05$.

Результаты исследований

В 1-й серии экспериментов, по данным гистологического анализа, установлено, что через 3 недели после моделирования ЦП у животных наблюдалась дезорганизация пластинчатого строения в области триады печени, в портальной зоне инициировалось разрастание соединительной ткани. В целом наблюдалось нарушение макро- и микроархитектоники печени с развитием дистрофии, гиперплазии и формированием очагового биллиарного цирроза. При анализе основных показателей в крови животных наблюдалось статистически значимое повышение по сравнению с интактными животными уровня АЛТ

(187 (90;287) Ед./л против 34 (27;42) Ед./л), щелочной фосфатазы (379 (267;473) Ед./л против 132 (116;153) Ед./л), общего билирубина (4,9 (4,1;7,8) мкмоль/л против 1,5 (1,4;1,6) мкмоль/л), желчных кислот (51 (44;63) против 18 (15;26) мкмоль/л).

Во 2-й серии экспериментов в контрольной группе (через 2 недели после перевода животных на стандартную диету) сохранялась дезорганизация структур печени, выявлялись очаги деструкции с участками реактивной перестройки в дольках печени. В анализах крови было выявлено снижение значений АЛТ до уровня интактных животных — 38 (32;47) Ед/л ($p>0,05$). При этом сохранялись повышенные уровни щелочной фосфатазы, общего билирубина и желчных кислот. В опытной группе введение ЯК в течение 2 недель приводило к усилению функциональной активности печени, увеличению количества фиксированных макрофагов и раскрытых желчных протоков и капилляров. При анализе основных показателей крови наблюдалась нормализация не только уровня АЛТ — 30 (27;38) Ед./л, но и щелочной фосфатазы — 160 (132;279) Ед./л, восстановление уровня желчных кислот — 28 (22;56) мкмоль/л и общего били-

рубина — 3,0 (3,0;3,3) мкмоль/л до уровня интактных животных.

Выводы

1. При экспериментальном ЦП выявлены выраженные изменения метаболизма, развитие цитолитического синдрома, холестаза, значительные нарушения функционального состояния гепатоцитов с повреждением внешних мембран клеток печени, приводящим к массивному некрозу гепатоцитов.

2. После отмены ацетаминофена и высокожировой диеты и с переводом животных на стандартный рацион через 2 недели наблюдалось разрешение цитолитического синдрома, однако сохранялись выраженные нарушения цитоархитектоники печени и пигментного обмена с признаками холестаза.

3. Введение ЯК на протяжении 2 недель приводило к разрешению холестатического синдрома, восстановлению показателей пигментного обмена, а также к нормализации цитоархитектоники печени.

4. Таким образом, ЯК как основа сукцинатсодержащих препаратов является эффективным гепатопротектором в метаболическом лечении цирроза печени.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

- Смирнов А.В., Нестерова О.Б., Голубев Р.В. Янтарная кислота и её применение в медицине. Ч. I. Янтарная кислота: метаболит и регулятор метаболизма организма человека. *Нефрология*. 2014;18(2):33–41. [Smirnov A.V., Nesterova O.B., Golubev R.V. Yantarnaya kislota i ee primeneniye v meditsine. Ch. I. Yantarnaya kislota: metabolit i regulator metabolizma organizma cheloveka [Succinic acid and its use in medicine. Part I. Succinic acid: Metabolite and regulator of the metabolism of the human body]. *Nefrology*. 2014;18(2):33–41. (In Russian)].
- Тропская Н.С., Кислякова Е.А., Вилкова И.Г. и др. Экспериментальная модель цирроза печени. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2019;3:391–396. [Tropskaya N.S., Kislyakova E.A., Vilkova I.G., et al. Eksperimental'naya model' tsirroza pecheni [Experimental model of liver cirrhosis]. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2019;3:391–396. (In Russian)].
- Шахмарданова С.А., Гулевская О.Н., Хананашвили Я.А. и др. Препараты янтарной и фумаровой кислот как средства профилактики и терапии различных заболеваний. *Журнал фундаментальной медицины и биологии*. 2016;3:16–30. [Shahmardanova S.A., Gulevskaya O.N., Hananashvili Ya.A., et al. Preparaty yantarnoy i fumarovoy kislot kak sredstva profilaktiki i terapii razlichnykh zabolevaniy [Preparations of succinic and fumaric acids as a means of prevention and therapy of various diseases]. *J. of Fundamental Medicine and Biology*. 2016;3:16–30. (In Russian)].

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Тропская Наталия Сергеевна*, д.б.н., ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗМ»; ФГБОУ ВО «Московский авиационный институт (национальный исследовательский университет)»;
e-mail: ntropskaya@mail.ru

Гурман Юлия Валерьевна, ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗМ»;
e-mail: julka_gurman95@mail.ru

Кислякова Екатерина Александровна, к.б.н., ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗМ»;
e-mail: kisliakovakatia@mail.ru

Вилкова Ирина Геннадьевна, ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗМ»;
e-mail: vilkovaig@yandex.ru

Клычникова Елена Валерьевна, к.м.н., ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗМ»;
e-mail: klychnikovaev@mail.ru

Байматов Валерий Нурмухаметович, д.вет.н., проф., ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии — МВА им. К.И. Скрябина»;
e-mail: baymatovvaleriy@rambler.ru

Попова Тамара Сергеевна, д.б.н., проф., ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗМ»;
e-mail: popovanutr@mail.ru

Nataliya S. Tropuskaya*, Dr. Sci. (Biol.), N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine of the Moscow Health Care Department; Moscow Aviation Institute (National Research University);
e-mail: ntropskaya@mail.ru

Yulia V. Gurman, N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine of the Moscow Health Care Department;
e-mail: julka_gurman95@mail.ru

Ekaterina A. Kislyakova, Cand. Sci. (Biol.), N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine of the Moscow Health Care Department;
e-mail: kisliakovakatia@mail.ru

Irina G. Vilkova, N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine of the Moscow Health Care Department;
e-mail: vilkovaig@yandex.ru

Elena V. Klychnikova, Cand. Sci. (Med.), N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine of the Moscow Health Care Department;
e-mail: klychnikovaev@mail.ru

Valeriy N. Baymatov, Dr. Sci. (Vet.), Prof., Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology named after K.I. Stryabin;
e-mail: baymatovvaleriy@rambler.ru

Tamara S. Popova, Dr. Sci. (Biol.), Prof., N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine of the Moscow Health Care Department;
e-mail: popovanutr@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author



МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ТИОЗОНИДА И АТФАЗЫ *M. TUBERCULOSIS* МЕТОДОМ МОЛЕКУЛЯРНОГО ДОКИНГА

Б.В. Шилов¹, А.С. Смирнов¹, А.Ю. Савченко^{2,*}

¹ ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России
117997, Российская Федерация, Москва, ул. Островитянова, 1

² ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»
143442, Российская Федерация, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, 1

Изучали механизм взаимодействия нового противотуберкулёзного препарата тиозонид с вероятной мишенью организма *M. tuberculosis*. Согласно полученным поисковым данным, наиболее вероятной мишенью с карманом связывания тиозонида являются субъединица бактериальной АТФ-синтазы — фермента, играющего ключевую роль в процессах энергообмена клетки, осуществляя сопряжение реакции синтеза/гидролиза АТФ с трансмембранным переносом протонов. Были построены оригинальные модели трёх субъединиц этого энзима (альфа, дельта и эпсилон). Для моделирования докинга *in silico* использована программа AutoDock версии 4.2, которая включена в состав комплекса MGL Tools версии 1.5.6. Показано, что все три субъединицы имеют кластеры с минимальными энергиями связывания для молекулы тиозонида, причём у субъединицы эпсилон два кластера с равными вероятностями быть сайтом связывания тиозонида.

Ключевые слова: тиозонид, молекулярный докинг, лиганд-белковые взаимодействия

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Шилов Б.В., Смирнов А.С., Савченко А.Ю. Моделирование взаимодействия тиозонида и АТФазы *M. tuberculosis* методом молекулярного докинга. *Биомедицина*. 2021;17(3E):170–175. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-170-175>

Поступила 11.05.2021

Принята после доработки 28.06.2021

Опубликована 20.10.2021

MODELING THE INTERACTION OF THIOZONIDE AND ATPHASE *M. TUBERCULOSIS* BY THE METHOD OF MOLECULAR DOCKING

Boris V. Shilov¹, Anton S. Smirnov¹, Alla Yu. Savchenko^{2,*}

¹ Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov
of the Ministry of Health Care of Russia
117997, Russian Federation, Moscow, Ostrovityanova Str., 1

² Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia
143442, Russian Federation, Moscow Region, Krasnogorsk District, Svetlye Gory Village, 1

The mechanism of interaction of a new anti-tuberculosis drug thiozonide with a probable target of *M. tuberculosis* was studied. According to the data obtained, the most likely target with a thiozonide binding pocket is the subunit of bacterial ATP synthase, an enzyme that plays a key role in the processes of energy exchange in

the cell, coupling the reaction of ATP synthesis/hydrolysis with transmembrane proton transfer. Original models of the three subunits of this enzyme (alpha, delta, and epsilon) were built. To simulate docking *in silico*, the AutoDock program version 4.2 was used, which is included in the MGL Tools version 1.5.6. It was shown that all three subunits have clusters with the minimum binding energies for the thiosinide molecule, and the epsilon subunit has two clusters with equal probabilities of being a thiosinide binding site.

Keywords: thiozonide, molecular docking, ligand-protein interactions

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Shilov B.V., Smirnov A.S., Savchenko A.Yu. Modeling the Interaction of Thiozonide and ATPase *M. tuberculosis* by the Method of Molecular Docking. *Journal Biomed.* 2021;17(3E):170–175. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-170-175>

Submitted 11.05.2021

Revised 28.06.2021

Published 20.10.2021

Введение

Несмотря на положительную динамику в борьбе с туберкулёзом, отмечается рост количества случаев туберкулёза с множественной, широкой и полной лекарственной устойчивостью возбудителя, когда возбудитель устойчив либо к препаратам 1-го ряда, либо обладает дополнительной резистентностью к фторхинолонам и хотя бы одному из препаратов 2-го ряда, либо вообще не поддаётся терапии всеми известными противотуберкулёзными препаратами (ПТП) [1, 2]. Варианты лечения туберкулёза оставались неизменными на протяжении последних 50 лет, что усугубило время лекарственной устойчивости. В последнее время надежды на эффективную терапию возлагаются в связи с появлением препаратов группы диарилхинолинов [3, 4], которые эффективно ингибируют микобактериальную АТФ-синтазу. Этот энзим необходим для оптимального роста *M. tuberculosis*, поскольку является ключевым ферментом, участвующим в энергетическом метаболизме, и поэтому рассматривается как многообещающая мишень для противотуберкулёзных препаратов [5, 6, 10].

Разработка отечественных учёных, инновационное ЛС с рабочим названием «тиозонид» — также представитель группы диарилхинолинов. Химически он пред-

ставляет собой -{1R,2S+1S,2R}-1-(6-Бром-2-хлорхинолил-3-ил)-4-(диметиламино)-2-(нафталин-1-ил)-1-фенилбутан-2-ол. Было показано, что противотуберкулёзная активность тиозонида в монотерапии на модели генерализованного туберкулёза у мышей сравнима с таковой препарата 2-го ряда рифампицина, тиозонид имеет ярко выраженный синергизм при совместном применении с изониазидом и рифампицином: сочетание этих препаратов приводило к практически полному излечению животных в течение двухмесячного курса терапии [7, 8].

Целью настоящего исследования было выявить вероятную мишень для активности тиозонида в отношении *M. tuberculosis* и определить возможность взаимодействия методом молекулярного докинга.

Материалы и методы

Для поиска мишеней к лиганду тиозониду *M. tuberculosis* были использованы возможности сервиса для предсказания мишеней лекарств SEA Search Service. Процедура предсказания основывается на проверке схожести молекул на основании коэффициента Танимото, указанного в последнем столбце на рис. 1, и основана на использовании химического сходства с лигандами, действие на мишени кото-

рых изучено и известно. Было проведено моделирование трёхмерных структур белковых субъединиц АТФ-синтазы микобактерии туберкулёза с помощью сервиса swiss-model ввиду отсутствия в базе данных PDB доступных моделей этого протеина. Для моделирования докинга *in silico* использована программа AutoDock версии 4.2, которая включена в состав комплекса MGL Tools версии 1.5.6. AutoDock разработан W. Lindstrom, G.M. Morris, C. Weber и R. Huey (The Scripps Research Institute Molecular Graphics Laboratory) [11]. Этот программный продукт позволяет проводить молекулярный докинг с целью поиска локального минимума энергии взаимодействия между лигандом и белком, а также проводить поиск глобального минимума энергии взаимодействия между лигандом и белком, если положение лиганд-связывающего центра не определено экспериментально [3].

Интерес представляли физико-химические механизмы взаимодействия, для определения геометрии лиганд-рецепторных комплексов рецепторов на основе использования экспериментальных данных о строении лиганд-связывающего центра. Эффективность докинга в данной программе повышается путём построения карт электростатических потенциалов, силового поля AMBER (Assisted Model Building with Energy

Refinement) [9]. Результаты, полученные с помощью программы Autodock, позволяют анализировать минимальную энергию связывания лиганда с макромолекулой, вероятность нахождения лиганда в активном центре белка в положении и конформации, отвечающем наименьшей энергии связывания, и среднеквадратичное отклонение найденного положения лиганда от данных рентгеноструктурного анализа.

Результаты исследований

Поиск мишеней к лиганду тиозониду *M. tuberculosis* в сервисе для предсказания мишеней лекарств SEA Search Service показал значительный потенциал для связывания с белками бактерий. В качестве вероятных ключевых таргетных макромолекул были найдены белки — субъединицы АТФ-синтазы микобактерии туберкулёза (рис. 1).

Согласно полученным поисковым данным, наиболее вероятной мишенью с карманом связывания тиозонида является субъединица бактериальной АТФ-синтазы — фермента, играющего ключевую роль в процессах энергообмена клетки, осуществляя сопряжение реакции синтеза/гидролиза АТФ с трансмембранным переносом протонов.

На рис. 2 представлены оригинальные модели трёх субъединиц этого энзима.

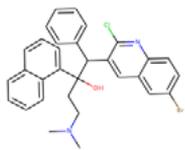
Query	Target Key	Target Name	Description	P-Value	MaxTC
 compound_1	Q5T0X5_MYCSM+5	atpE	ATP synthase subunit c	1.269e-119	0.78
	ATP6_MYCTU+5	atpB	ATP synthase subunit a	1.522e-100	0.55
	ATPA_MYCTU+5	atpA	ATP synthase subunit alpha	1.522e-100	0.55
	ATPB_MYCTU+5	atpD	ATP synthase subunit beta	1.522e-100	0.55
	ATPE_MYCTU+5	atpC	ATP synthase epsilon chain	1.522e-100	0.55
	ATPFD_MYCTU+5	atpFH	ATP synthase subunit b-delta	1.522e-100	0.55
	ATPF_MYCTU+5	atpF	ATP synthase subunit b	1.522e-100	0.55
	ATPG_MYCTU+5	atpG	ATP synthase gamma chain	1.522e-100	0.55
	ATPL_MYCTU+5	atpE	ATP synthase subunit c	1.522e-100	0.55
	ATPL_BACP3+5	atpE	ATP synthase subunit c	7.119e-01	0.78

Рис. 1. Скриншот сервиса SEA Search Service с выявленными мишенями тиозонида у *M. tuberculosis*.

Fig. 1. Screenshot of the SEA Search Service with identified targets of thiozonide in *M. tuberculosis*.

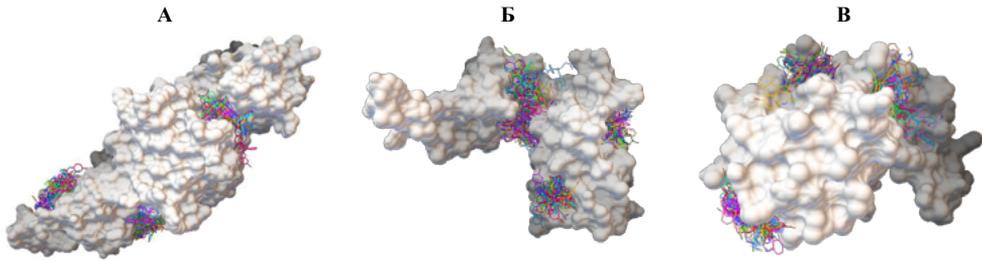


Рис. 2. Модели субъединиц АТФ-синтазы *M. tuberculosis* (А — альфа, Б — дельта, В — эpsilon) с наиболее вероятными участками закрепления молекулы тиозонида с выявленными мишенями тиозонида у *M. tuberculosis*.

Fig. 2. Models of *M. tuberculosis* ATP synthase subunits (А — alpha, Б — delta, В — epsilon) with the most likely sites for fixation of the thioisonide molecule with the revealed thioisonide targets in *M. tuberculosis*.

Как показало моделирование взаимодействия тиозонида с альфа-субъединицей АТФ-синтазы *M. tuberculosis*, с наибольшей вероятностью существуют три кластера связывания, каждый из которых не превышает размер 15 ангстрем. Первый кластер (с наименьшей энергией связывания и наибольшей аффинностью молекулы тиозонида к точке связывания) сформирован 18 конформациями лиганда (тиозонида) и характеризуется минимальной энергией связывания — 8,9 ккал/моль и максимальной — 5,7 ккал/моль. Наиболее вовлечёнными во взаимодействие аминокислотами энзима являются следующие: gln151, arg165, asp192, asn193, trp194, ala441, val442, glu443, ile486, ala487.

В отношении взаимодействия тиозонида с дельта-субъединицей АТФ-синтазы *M. tuberculosis* показано, что наиболее вероятно такое в трёх кластерах связывания, каждый из которых не превышает размер 15 ангстрем. Первый кластер (с наименьшей энергией связывания и наибольшей аффинностью молекулы тиозонида к точке связывания) содержит 22 конформации лиганда и характеризуется минимальной энергией связывания — 9,1 ккал/моль и максимальной — 7,04 ккал/моль. Наиболее вовлечённые во взаимодействие аминокисло-

ты представлены в списке: arg188, trp189, glu200, his201, val202, ser203, arg204, gln205, ala206, glu209, ley210, arg213.

Для эpsilon-субъединицы АТФ-синтазы *M. tuberculosis* также показаны три кластера связывания, каждый из которых не превышает размер 15 ангстрем. Первый кластер (с наименьшей энергией связывания и наибольшей аффинностью молекулы тиозонида к точке связывания) оказался самым большим и содержал 57 конформаций (из 100 рассчитанных) тиозонида. Его характеризовала минимальная энергией связывания — 11,05 ккал/моль и максимальная — 7,71 ккал/моль. Наиболее вовлечёнными во взаимодействие аминокислотами являются: phe6, tyr37, pro38, met39, his40, thr41, val73, gln74, pro75, asn76, gly77.

Заключение

Представленные результаты докинга тиозонида в молекулу АТФ-синтазы *M. tuberculosis* позволяют заключить, что все три субъединицы (альфа, дельта и эpsilon) изучаемого бактериального энзима пригодны в качестве точек связывания с лигандом тиозонида. В каждой из них определено до трёх наиболее аффинных центров связывания с молекулой нового противотуберкулёзного препарата.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Бочарова И.В., Буренков М.С., Лепеха Л.Н., Смирнова Т.Г., Черноусова Л.Н., Демихова О.В. Доклинические исследования специфической активности нового противотуберкулёзного препарата тиозонид. *Туберкулёз и болезни лёгких*. 2014;6:46–50. [Bocharova I.V., Burenkov M.S., Lepexha L.N., Smirnova T.G., Chernousova L.N., Demihova O.V. Doklinicheskie issledovaniya spetsificheskoy aktivnosti novogo protivotuberkuleznogo preparata tiozonid [Preclinical studies of the specific activity of the new anti-TB drug thiozonide]. *Tuberkulioz i bolezni legkih [Tuberculosis and lung disease]*. 2014;(6):46–50. (In Russian)]. DOI: 10.21292/2075-1230-2014-0-6-46-50.
2. Меньшикова Л.А. *Фармакокинетическое исследование оригинального лекарственного средства тиозонида*: Автореф. дис. ... канд. фарм. наук. М., 2016. [Men'shikova L.A. *Farmakokineticheskoe issledovanie original'nogo lekarstvennogo sredstva tiozonida [Pharmacokinetic study of the original drug thiozonide]*: Abstract of diss. ... cand. pharm. sci. Moscow, 2016. (In Russian)].
3. Шадрин М.С., Рогов А.В., Бравая К.Б., Немухин А.В. Молекулярный докинг производных гуанозиннуклеотидов в ГТФ-связывающие белки. *Вестник Московского Университета. Сер. 2. Химия*. 2005;46(6):363–369. [Shadrina M.S., Rogov A.V., Bravaya K.B., Nemuhin A.V. Molekulyarnyy doking proizvodnykh guanozinnukleotidov v GTF-svyazyvayushchie belki [Molecular docking of guanosine nucleotide derivatives into GTP-binding proteins]. *Vestnik Moskovskogo Universiteta. Ser. 2. Himiya [Moscow University Bulletin. Ser. 2. Chemistry]*. 2005;46(6):363–369. (In Russian)].
4. Diacon A.H., Pym A., Grobusch M., Patientia R., Rustomjee R., Page-Shipp L., Pistorius C., Krause R., Bogoshi M., Churchyard G., Venter A., Allen J., Palomino J.C., De Marez T., van Heeswijk R.P.G., Lounis N., Meyvisch P., Verbeeck J., Parys W., de Beule K., Andries K., Neeley D.F.M. The Diarylquinoline TMC207 for multidrug-resistant tuberculosis. *N. Engl. J. Med.* 2009;360(23):2397–2405. DOI: 10.1056/NEJMoa0808427.
5. Esposito S., D'Ambrosio L., Tadolini M., Schaaf H.S., Caminero L.J., Marais B., Centis R., Dara M., Matteelli A., Blasi F., Migliori G.B. ERS/WHO Tuberculosis Consilium assistance with extensively drug-resistant tuberculosis management in a child: Case study of compassionate delamanid use. *Eur. Respiratory J.* 2014;44:811–815. DOI: 10.1183/09031936.00060414.
6. Koul A., Dendouga N., Vergauwen K., Molenberghs B., Vranckx L., Willebrords R., Ristic Z., Lill H., Dorange I., Guillemont J., Bald D., Andries K. Diarylquinolines target subunit c of mycobacterial ATP synthase. *Nat. Chem. Biol.* 2007;3:323–324. DOI: 10.1038/nchembio884.
7. Klopper M., Warren R.M., Hayes C., Gey van Pittius N.C., Streicher E.M., Müller B., Sirgel F.A., Chabula-Nxiweni M., Hoosain E., Coetzee G., van Helden P.D., Victor T.C., Trollip A. Ph. Emergence and spread of extensively and totally drug-resistant tuberculosis, South Africa. *Emerging Infectious Disease J.* 2013;19:449. DOI: 10.3201//EID1903.120246.
8. Ndjeka N., Schnippel K., Master I., Meintjes G., Maartens G., Romero R., Padanilam X., Enwerem M., Chotoo S., Singh N., Hughes J., Variava E., Ferreira H., te Riele J., Ismail N., Mohr E., Bantubani N., Conradie F. High treatment success rate for multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis using a bedaquiline-containing treatment regimen. *Eur. Respir. J.*, 2018;52(6). DOI: 10.1183/13993003.01528-2018.
9. Prasad P.A., Kanagasabai V., Arunachalam J. *Exploring conformational space using a mean field technique with MOLS sampling*. University of Madras, Guindy Campus, Chennai, India. 2007.
10. Sasseti C.M., Boyd D.H., Rubin E.J. Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. *Mol. Microbiol.* 2003;48(1):77–84. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2003.03425.x.
11. <http://autodock.scripps.edu>.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Шилов Борис Владимирович, к.м.н., доц., ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России;

e-mail: borisshilov@gmail.com

Смирнов Антон Сергеевич, ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России;

e-mail: anton.smirnov.9910@gmail.com

Boris V. Shilov, Cand. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov of the Ministry of Health Care of Russia;

e-mail: borisshilov@gmail.com

Anton S. Smirnov, Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov of the Ministry of Health Care of Russia;

e-mail: anton.smirnov.9910@gmail.com

Савченко Алла Юрьевна*, ФГБУН «Научный
центр биомедицинских технологий ФМБА
России»;
e-mail: alursav@mail.ru

Alla Yu. Savchenko*, Scientific Center
of Biomedical Technologies of the Federal Medical
and Biological Agency of Russia;
e-mail: alursav@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author



БИОИНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ УРОВНЯ ОСТЕОМАРКЕРОВ В ДЕСНЕВОЙ ЖИДКОСТИ ПРИ СИСТЕМНОМ ОСТЕОПОРОЗЕ И МЕСТНЫХ ОСТЕОДЕСТРУКТИВНЫХ ПРОЦЕССАХ ДЕНТОАЛЬВЕОЛЯРНОЙ ОБЛАСТИ

А.В. Сафроненко¹, В.А. Косенко¹, Г.А. Айрапетов², И.А. Демидов^{1*},
М.И. Нажева¹, В.М. Поляков¹

¹ ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России
344022, Российская Федерация, Ростов-на-Дону, Нахичеванский пер., 29

² ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России
344037, Российская Федерация, Ростов-на-Дону, 14-я линия, 63

На 57 больных и 15 практически здоровых людях проанализирована информативность оценки биохимических маркеров в десневой жидкости при системных и местных изменениях костной ткани различного генеза. Выделены три группы больных: группа 1 — 20 пациентов с язвенным колитом и стероидным остеопорозом вследствие терапии глюкокортикоидами; группа 2 — 22 пациента, у которых диагностирован рак слизистой оболочки дна полости рта с эрозией кортикальной кости либо зубной лунки первичной опухолью; группа 3 — 15 человек со среднетяжёлым дентальным перимплантитом. В качестве исследуемого материала использовали десневую жидкость. Определяли содержание катепсина К, тартрат-резистентной кислой фосфатазы, костной фракции щелочной фосфатазы. Установлено, что при стероидном остеопорозе из трёх исследуемых маркеров в десневой жидкости статистически значимо повышался уровень катепсина К. В группе 2 при опухолевой остеодеструкции в десневой жидкости наблюдался десятикратный прирост концентрации катепсина К и ТРКФ на фоне умеренного повышения содержания костной фракции щелочной фосфатазы. При остеодеструкции, сопряжённой с воспалительными дентоальвеолярными процессами, имело место умеренное повышение концентрации катепсина К и тартрат-резистентной кислой фосфатазы. Таким образом, определение остеомаркеров в десневой жидкости информативно для разграничения системных и местных изменений структуры костной ткани.

Ключевые слова: остеопороз, остеомаркеры, глюкокортикостероиды, рак слизистой оболочки полости рта, десневая жидкость

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Сафроненко А.В., Косенко В.А., Айрапетов Г.А., Демидов И.А., Нажева М.И., Поляков В.М. Биоинформационный анализ уровня остеомаркеров в десневой жидкости при системном остеопорозе и местных остеодеструктивных процессах дентоальвеолярной области. *Биомедицина*. 2021;17(3E):176–182. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-176-182>

Поступила 20.04.2021

Принята после доработки 03.06.2021

Опубликована 20.10.2021

BIOINFORMATICAL ANALYSIS OF THE LEVEL OF OSTEOMARKERS IN THE GINGIVAL FLUID IN SYSTEMIC OSTEOPOROSIS AND LOCAL OSTEO-DESTRUCTIVE PROCESSES IN THE DENTOALVEOLAR REGION

Andrey V. Safronenko¹, Vladislav A. Kosenko¹, Grigory A. Airapetov², Igor A. Demidov^{1*},
Marina I. Nazheva¹, Valery M. Polyakov¹

¹ Rostov State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia
344022, Russian Federation, Rostov-on-Don, Nakhichevskiy Lane, 29

² National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health Care of Russia
344037, Russian Federation, Rostov-on-Don, 14th Line, 63

The informational value of assessing biochemical markers in the gingival fluid of patients with various systemic and local changes in bone tissue was analyzed in a sample of 57 patients and 15 healthy people. The patients were differentiated into 3 groups: 1) 20 patients with ulcerative colitis and steroid osteoporosis due to glucocorticoid therapy; 2) 22 patients diagnosed with cancer of the mucous membrane of the floor of the mouth with erosions of the cortical bone or dental socket by a primary tumor; 3) 15 patients with moderate dental peri-implantitis. Gingival fluid was used as a test material. The content of cathepsin K, tartrate-resistant acid phosphatase, and bone fraction of alkaline phosphatase was determined. In steroid osteoporosis, the cathepsin K level in the gingival fluid was found to be statistically significantly increased compared to other markers under study. In group 2, with tumor osteodestruction in the gingival fluid, a 10-fold increase in the concentration of cathepsin K and tartrate-resistant acid phosphatase was observed against the background of a moderate increase in the bone fraction of alkaline phosphatase content. In osteodestruction associated with inflammatory dentoalveolar processes, a moderate increase in the concentration of cathepsin K and tartrate-resistant acid phosphatase was observed. Thus, the determination of osteomarkers in the gingival fluid can be considered informative in terms of distinguishing between systemic and local changes in the structure of bone tissue.

Keywords: osteoporosis, osteomarkers, glucocorticosteroids, cancer of the oral mucosa, gingival fluid

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Safronenko A.V., Kosenko V.A., Airapetov G.A., Demidov I.A., Nazheva M.I., Polyakov V.M. Bioinformatic Analysis of the Level of Osteomarkers in the Gingival Fluid in Systemic Osteoporosis and Local Osteo-Destructive Processes in the Dentoalveolar Region. *Journal Biomed.* 2021;17(3E):176–182. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-176-182>

Submitted 20.04.2021

Revised 03.06.2021

Published 20.10.2021

Введение

В клинической лабораторной практике широко используется определение медиаторов воспаления в биологических жидкостях полости рта. Измерение концентрации цитокинов, белков острой фазы воспаления, антимикробных пептидов в слюне и десневой жидкости, экссудате позволяет контролировать степень воспаления, эффективность лечения, мониторировать

состояние в период реабилитации и прогнозировать обострение хронических воспалительных заболеваний полости рта [2]. Однако воспалительные процессы ротовой полости часто сопряжены с деструктивными процессами в костной ткани пародонта, альвеолярных отростков челюстей [5]. Для контроля поражения костной ткани в стоматологии используется широкий спектр методов лучевой диагностики, пре-

имущественно компьютерная томография [1, 6]. Информационный потенциал определения остеомаркеров в жидкостях полости рта при контроле местной остеодеструкции остаётся неостребованным как при воспалительных, так и при опухолевых заболеваниях. Между тем, остеомаркеры являются чувствительными индикаторами состояния костного ремоделирования, баланса между остеорезорбтивными и остеобразующими процессами [3], их определение неинвазивно, не требует дорогостоящей аппаратуры и может выполняться в любой лаборатории с сертифицированным аппаратным обеспечением для иммуноферментного анализа. Много неясных моментов остаётся в отношении того, насколько изменения остеомаркеров при системном остеопорозе сказываются на составе десневой жидкости как трансудате крови. Часто изменения остеомедиаторов в биологических жидкостях происходят раньше, чем остеодеструкция выявляется впоследствии при лучевых методах исследования костной ткани [4].

Целью работы явилось определить информативность оценки биохимических маркеров в десневой жидкости при системном остеопорозе, деструктивных костных изменениях в дентоальвеолярной области воспалительного и опухолевого генеза.

Материалы и методы

Проведённое исследование явилось многоцентровым и одобрено локальным независимым этическим комитетом ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России и ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России.

Всего в исследование были включены 57 больных в возрасте 30–75 лет обоего пола. В зависимости от распространённости, локализации и генеза деструкции костной ткани выделяли три группы боль-

ных: группа 1 — 20 пациентов с язвенным колитом и стероидным остеопорозом вследствие терапии глюкокортикоидами; группа 2 — 22 пациента, у которых диагностирован рак слизистой оболочки дна полости рта с эрозией кортикальной кости либо зубной лунки первичной опухолью; группа 3 — 15 пациентов со среднетяжёлым дентальным периимплантитом.

15 человек представляли собой практически здоровых лиц, которые вошли в группу контроля.

Критерии включения пациентов в группу 1: верифицированный язвенный колит (ЯК) с длительностью заболевания не менее года и наличием не менее двух рецидивов в анамнезе; левосторонний и тотальный ЯК, средняя степень активности, показания для системного введения глюкокортикоидов (отсутствие эффекта от 5-аминосалициловой кислоты через 2 недели применения), информированное согласие пациента.

Критерии включения пациентов в группу 2: рак слизистой оболочки дна полости рта с эрозией кортикальной кости либо зубной лунки первичной опухолью; возраст больных до 75 лет включительно; отсутствие до момента исследования специализированного лечения онкологического заболевания. В группу 2, согласно классификации стадий развития злокачественных опухолей TNM (8-е издание), включали больных с умеренно местно-распространённым раком T4aN0-2M0. Наличие только поверхностных эрозий кости/зубной лунки первичной опухолью десны было недостаточно для её классифицирования как стадии T4_b. Согласно критериям гистопатологической дифференцировки, у 15 (68%) пациентов наблюдалась низкая и у 7 (32%) — средняя степень дифференцировки опухолевых клеток.

Критерии включения пациентов в группу 3: дентальный периимплантит; возраст больных 30–75 лет, локализация — нижняя челюсть.

Критерии исключения: тяжёлая общесоматическая патология — ВИЧ, СПИД, сопутствующая патология с декомпенсацией дыхательной, сердечно-сосудистой и мочевыделительной систем, системный приём стероидных или нестероидных противовоспалительных препаратов.

Группа контроля из 15-ти практически здоровых лиц (8 мужчин и 7 женщин) без воспалительных заболеваний пародонта в возрасте 40–60 лет была сформирована для определения контрольных значений биохимических маркеров.

Средний возраст пациентов группы 1 составлял $45,8 \pm 2,24$ года (медиана — 46 лет), группы 2 — $53,2 \pm 2,5$ года (медиана — 51 год), группы 3 — $55,7 \pm 2,3$ года (медиана — 56 лет). В группу 1 вошли 14 (70%) женщин и 6 (30%) мужчин. В группу 2 — 15 мужчин (68%) и 7 (32%) женщин. В группе 3 состояли 7 (78%) мужчин и 2 (22%) женщины.

Лабораторную часть исследования проводили с привлечением иммуноферментного и биохимического анализа. В качестве исследуемого материала использовали десневую жидкость или экссудат периимплантационных карманов. Сбор жидкости осуществляли при помощи пинцета стерильным бумажным эндодонтическим штифтом размером № 25, помещая его в карман или зубодесневую борозду не менее чем на 10 секунд на максимальную глубину. Объём экссудата определяли по разнице весов бумажного штифта до и после сорбции экссудата.

Содержание катепсина К (КК) в десневой жидкости определяли с помощью набора реактивов Cathepsin K (CTSK) (Human) ELISA Kit («Cloud-Clone Corp.», США). Для определения концентрации тартрат-резистентной кислой фосфатазы использовали набор реактивов Bone TRAP (TRAP5b) Assay (Immunodiagnostic Systems, «IDS», Англия). TRACP 5b представлял собой активный фермент, выделяющийся из осте-

окластов. Для проведения иммуноферментного анализа использовали фотометр Multiscan-P 2 («Thermo Fisher Scientific Inc.», Финляндия) при длине волны 450 нм. Определение активности костной фракции щелочной фосфатазы (ЩФ) проводили кинетическим методом. Активность ЩФ в биологической жидкости определялась путём измерения скорости гидролиза эфира фосфорной кислоты — п-нитрофенилфосфата с получением п-нитрофенола и фосфорной кислоты. Скорость гидролиза субстрата прямо пропорциональна активности фермента.

Статистический анализ результатов исследования проводился с помощью программы Statistica 12.0 («StatSoft Inc.», США) и применением теста на нормальность с использованием критерия Шапиро — Уилка, описательной статистики, дисперсионного анализа.

Результаты и их обсуждение

У пациентов контрольной группы в десневой жидкости концентрация КК составила $1,71 \pm 0,34$ пмоль/л (медиана — 1,8 пмоль/л), тартрат-резистентной кислотой фосфатазы (ТРКФ) — $3,7 \pm 0,5$ Ед/л (медиана — 3,64 Ед/л), активность ЩФ была $4,2 \pm 0,6$ мкмоль/л (медиана — 4,11 мкмоль/л). Полученные значения использовали в качестве контрольных.

У пациентов об активности остеорезорбции альвеолярных отростков челюстей судили по концентрации в десневой жидкости лизосомального фермента КК и фермента шероховатого эндоплазматического ретикулума ТРКФ, которые высвобождаются при активации остеокластов в костные лакуны и участвуют в резорбции кости [7–9].

В группе 1 при формировании стероидной зависимости выявлены повышенные концентрации КК в десневой жидкости ($4,1 \pm 0,5$ пмоль/л). Концентрация остальных изучаемых остеомаркеров не отличалась от контрольных величин.

В группе 2 было установлено многократное превышение концентрации КК в десневой жидкости при раке слизистой оболочки дна полости рта с распространением на альвеолярный отросток (11,4±0,6 пмоль/л). Содержание КК в десневой жидкости в группе 2 по сравнению с контрольной группой было выше в 6,6 раза (p<0,001).

В группе 3 в эксудате периимплантационной борозды содержание КК (4,7±0,4 пмоль/л) возрастало по сравнению с контролем в 2,5 раза (p<0,001) (табл.).

В группах 2 и 3 относительно похожее различие было установлено и для концентрации ТРКФ в десневой жидкости. В группе 2 в десневой жидкости кратность превышения маркера остеорезорбции составила 3,2 раза (11,7±0,7 Ед/л), а в группе 3 в эксудате периимплантационной борозды концентрация ТРКФ (5,9±0,7 Ед/л) была выше в 1,6 раза (p<0,05) относительно контрольного значения (3,7±0,5 Ед/л).

Таким образом, определение маркеров остеорезорбции КК и ТРКФ в десневой жидкости позволило дать оценку изменения костного метаболизма при системной и местной остеодеструкции различного генеза. В исследовании было установ-

лено, что при системном остеопорозе в десневой жидкости из остеомаркеров статистически значимо повышалась концентрация только КК. КК и ТРКФ в значительной мере накапливались в десневой жидкости при опухолевой остеодеструкции. При воспалительно-деструктивных процессах у пациентов с периимплантатом маркеры остеорезорбции накапливались локально (в периимплантационной области), прирост накопления не превышал трёхкратного повышения по сравнению с контрольными значениями.

Стадия резорбции костной ткани в норме находится в паритете с процессами костеобразования, осуществляемыми остеообластами [10]. Механизмы дифференцировки остеообластов изучены недостаточно [6]. Однако известно, что молодые клетки синтезируют главным образом костную ЩФ, в то время как зрелые клетки синтезируют остеокальцин и осуществляют процессы кальцификации, превращаясь в остеоциты [5]. В содержимом десневой жидкости в группах 1 и 3 активность ЩФ по сравнению с контролем не изменялась, а в группе 2 была в 3,6 раза (p<0,05) выше (табл.). Таким образом, в группе 2 наблюдалось

Таблица. Значения концентрации остеомаркеров в десневой жидкости в клинических группах
Table. Concentration of osteomarkers in the gingival fluid in the research groups

Показатель	Величина	Группа 1 (n=20)	Группа 2 (n=22)	Группа 3 (n=15)	Контрольная группа (n=15)	P
КК, пмоль/л	<i>M±m</i>	4,1±0,5	11,4±0,6	4,7±0,4	1,71±0,34	$p_{1-к, 2-к} < 0,001$ $p_{3-к} < 0,001$ $p_{мин} < 0,001$
	<i>Me</i>	4,3	11,8	4,5	1,8	
	[25; 75]	3,7; 4,8	6,7; 14,3	3,8; 5,4	1,3; 2,4	
ТРКФ, Ед/л	<i>M±m</i>	4,0±0,3	11,7±0,7	5,9±0,7	3,7±0,5	$p_{1-к} > 0,05$ $p_{2-к} < 0,001$ $p_{3-к} = 0,03$ $p_{мин} < 0,001$
	<i>Me</i>	3,9	11,6	5,6	3,64	
	[25; 75]	3,5; 4,6	8,6; 14,4	4,3; 6,7	3,1; 4,4	
ЩФ, мкмоль/л	<i>M±m</i>	4,8±0,6	14,3±0,5	5,6±0,8	4,2±0,6	$p_{1-к, 3-к} > 0,05$ $p_{2-к} < 0,001$ $p_{мин} > 0,05$
	<i>Me</i>	4,7	14,7	9,5	4,11	
	[25; 75]	3,9; 5,3	10,3; 18,5	7,8; 11,4	3,8; 4,7	

Примечание: *Me* — медиана, [25; 75] — межквартильный диапазон, при дисперсионном анализе использовали критерий Краскела — Уоллиса и Манна — Уитни, поправочный коэффициент на число сравниваемых пар Бонферрони, $p_{мин}$ — доверительная вероятность сравнения всех групп.

Note: *Me* — median, [25; 75] — interquartile range, analysis of variance using the Kruskal — Wallis and Mann — Whitney test, a correction factor for the number of compared Bonferroni pairs, $p_{мин}$ — the confidence level of comparison between the groups.

умеренное усиление продукции активированными остеобластами ЩФ.

Итак, биохимические маркеры являются чувствительными индикаторами остеоремоделирования костной ткани как при системных, так и при локальных деструктивных процессах, при периимплантите и первичном опухолевом поражении челюстей. Оценка маркеров костного метаболизма в биологических жидкостях может использоваться как при диагностике, так и в последующем, при лечении остеомодифицирующими лекарственными средствами.

Выводы

1. Для контроля стероидного остеопороза у больных язвенным колитом

при системном применении глюкокортикоидов необходимо исследовать активность катепсина К иммуноферментным методом в десневой жидкости.

2. При раке слизистой оболочки дна полости рта десятикратный прирост концентрации катепсина К и тартрат-резистентной кислой фосфатазы, трёхкратный прирост активности костной фракции щелочной фосфатазы в десневой жидкости сопряжён с распространением опухолевого процесса на костную ткань.

3. При периимплантите для контроля выраженности остеорезорбции в периимплантационной области в экссудате рекомендуется определять концентрацию катепсина К и тартрат-резистентной кислой фосфатазы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Гончаров И.Ю., Ломакин М.В., Козлова М.В., Гончаров Ю.И. Особенности архитектоники подбородочного отдела нижней челюсти и применение методов лучевой диагностики для их объективизации. *Российский вестник дентальной имплантологии*. 2013;1(27):14–22. [Goncharov I.Yu., Lomakin M.V., Kozlova M.V., Goncharov Yu.I. Osobennosti arkhitektoniki podborodochного отдела nizhney chelyusti i primeneniye metodov luchevoy diagnostiki dlya ikh ob"ektivizatsii [Features of the architectonics of the chin of the lower jaw and the use of methods of radiation diagnostics for their objectivity]. *Rossiyskiy vestnik dental'noy implantologii [Russian Bulletin of Dental Implantology]*. 2013;1(27):14–22. (In Russian)].
2. Зорина О.А., Амхадова М.А., Хамукова А.А., Алескеров Э.Ш., Айрапетов Г.А., Демидова А.А. Особенности остеоммунологических аспектов остеорезорбции при периимплантите, хроническом пародонтите и раке альвеолярного отростка и альвеолярной части челюстей. *Стоматология*. 2020;99(4):27–32. [Zorina O.A., Amhadova M.A., Hamukova A.A., Aleskerov E.Sh., Ajrapetov G.A., Demidova A.A. Osobennosti osteoimmunologicheskikh aspektov osteorezorbtsii pri periimplantite, khronicheskom parodontite i rake al'veolyarnogo otrostka i al'veolyarnoy chasti chelyustey [Osteoimmunological aspects of periodontal inflammatory destructive changes at periimplantitis, chronic periodontitis and oncological diseases of the oral cavity]. *Stomatology*. 2020;99(4):27–32. (In Russian)]. DOI: 10.17116/stomat20209904127.
3. Любимова Н.В., Кушлинский Н.Е. Биохимические маркеры метастазирования в кости. *Успехи молекулярной онкологии*. 2015;1(2):61–75. [Lyubimova N.V., Kushlinskiy N.E. Biokhimicheskie markery metastazirovaniya v kosti [Biochemical markers of bone metastasis]. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii [Advances in molecular oncology]*. 2015;1(2):61–75. (In Russian)]. DOI: 10.17650/2313-805X.2015.2.1.061-075.
4. Цориев Т.Т., Белая Ж.Е., Рожинская Л.Я., Мельниченко Г.А., Ильин А.В., Никанкина Л.В., Дедов И.И. Новые биомаркеры регуляции костного ремоделирования при акромегалии и эндогенном гиперкортицизме. *Ожирение и метаболизм*. 2018;15(3):33–41. [Tsoriev T.T., Belaya Z.E., Rozhinskaya L.Ya., Mel'nichenko G.A., Ilyin A.V., Nikankina L.V., Dedov I.I. Novye biomarkery regulyatsii kostnogo remodelirovaniya pri akromegalii i endogennom giperkortitsizme [New biomarkers of bone remodelling regulation in patients with acromegaly and endogenous hypercortisolism]. *Ozhirenie i metabolism [Obesity and Metabolism]*. 2018;15(3):33–41. (In Russian)]. DOI: 10.14341/OMET9447.
5. Bessueille L., Mebarek S., Briolay A., Gleizes M. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase is an anti-inflammatory nucleotidase. *Bone*. 2020;133:115262. DOI: 10.1016/j.bone.2020.115262.
6. Bishop N. Bone material properties in osteogenesis imperfecta. *J. Bone Miner Res*. 2016;31(4):699–708. DOI: 10.1002/jbmr.2835.
7. Dai R., Wu Z., Chu H.Y., Lu J., Lyu A., Liu J., Zhang G. Cathepsin K: The action in and beyond bone.

- Front. Cell Dev. Biol.* 2020;8:433. DOI: 10.3389/fcell.2020.00433.
8. Drake M.T., Clarke B.L., Oursler M.J., Khosla S. Cathepsin K inhibitors for osteoporosis: Biology, potential clinical utility, and lessons learned. *Endocr. Rev.* 2017;38:325–350. DOI: 10.1210/er.2015-1114.
9. Hu Y., Yu J., Wang Q., Zhang L., Chen X., Cao Y., Zhao J., Xu Y. Tartrate-resistant acid phosphatase 5/ACP5 interacts with p53 to control the expression of SMAD3 in lung adenocarcinoma. *Molecular Therapy: Oncolytics.* 2020;16:272–288. DOI: 10.1016/j.omto.2020.01.010.
10. Takito J., Inoue S., Nakamura M. The sealing zone in osteoclasts: A self-organized structure on the bone. *Int. J. Mol. Sci.* 2018;19:984. DOI: 10.3390/ijms19040984.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Сафроненко Андрей Владимирович, д.м.н., доц., ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России;
e-mail: andrejsaf@mail.ru

Косенко Владислав Анатольевич, ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России;
e-mail: kosenkovla@rambler.ru

Айрапетов Григорий Арамович, ФГБУ «Национальный исследовательский центр онкологии» Минздрава России;
e-mail: stomat@mail.ru

Демидов Игорь Анатольевич*, к.м.н., ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России;
e-mail: demidova-66@yandex.ru

Нажева Марина Ибрагимовна, к.м.н., доц., ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России;
e-mail: nazheva@mail.ru

Поляков Валерий Михайлович, ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России;
e-mail: polyakovvalm@rambler.ru

Andrey V. Safronenko, Cand. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Rostov State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: andrejsaf@mail.ru

Vladislav A. Kosenko, Rostov State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: kosenkovla@rambler.ru

Grigory A. Airapetov, National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: stomat@mail.ru

Igor A. Demidov*, Cand. Sci. (Med.), Rostov State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: demidova-66@yandex.ru

Marina I. Nazheva, Cand. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Rostov State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: nazheva@mail.ru

Valery M. Polyakov, Rostov State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: polyakovvalm@rambler.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author



ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ ОПТИМИЗАЦИЯ ПРЕМЕДИКАЦИИ ДЛЯ СНИЖЕНИЯ РИСКА СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ

А.В. Сафроненко, Ю.С. Макляков, С.В. Лепявка, И.А. Демидов*,
А.А. Демидова, И.В. Дубатова

ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России
344022, Российская Федерация, Ростов-на-Дону, Нахичеванский пер., 29

На 46 больных с артериальной гипертензией, аритмиями и амиодарон-ассоциированным тиреотоксикозом I типа было доказано, что пролонгированная премедикация бензодиазепинами длительного действия и препаратами магния снижала риск развития сердечно-сосудистых осложнений и нестабильности системной гемодинамики, нивелировала неблагоприятные последствия на сердечно-сосудистую систему амиодарон-ассоциированной дисфункции щитовидной железы. После операции при пролонгированной премедикации бензодиазепинами длительного действия и препаратами магния нарушения ритма сердца встречались реже. При резком ограничении сроков подготовки больного к операции назначение бензодиазепинов длительного действия имело преимущества перед бензодиазепинами короткого действия ввиду профилактики развития нарушений ритма сердца и повышения артериального давления в ранний послеоперационный период.

Ключевые слова: премедикация, бензодиазепины, амиодарон, тиреотоксикоз, артериальная гипертензия

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Сафроненко А.В., Макляков Ю.С., Лепявка С.В., Демидов И.А., Демидова А.А., Дубатова И.В. Фармакологическая оптимизация премедикации для снижения риска сердечно-сосудистых осложнений. *Биомедицина*. 2021;17(3E):183–191. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-183-191>

Поступила 20.04.2021

Принята после доработки 03.06.2021

Опубликована 20.10.2021

PHARMACOLOGICAL OPTIMIZATION OF PREMEDICATION TO REDUCE THE RISK OF CARDIOVASCULAR COMPLICATIONS

Andrey V. Safronenko, Yuri S. Maklyakov, Sergey V. Lepyavka, Igor A. Demidov*,
Aleksandra A. Demidova, Irina V. Dubatova

Rostov State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia
344022, Russian Federation, Rostov-on-Don, Nakhichevanskiy Lane, 29

In 46 patients with arterial hypertension, arrhythmias and amiodarone-associated type I thyrotoxicosis, it was confirmed that prolonged premedication with long-acting benzodiazepines and magnesium preparations reduces the risk of cardiovascular complications and instability of systemic hemodynamics, mitigates the adverse effects of amiodarone dysfunction of the thyroid gland on the cardiovascular system. Post-operatively, under prolonged premedication with long-acting benzodiazepines and magnesium preparations, postoperative cardiac arrhythmias were found to be less common. When the pre-operative period was

significantly reduced, the appointment of long-acting benzodiazepines had advantages over short-acting benzodiazepines due to the prevention of cardiac arrhythmias and increased blood pressure in the early post-operative period.

Keywords: premedication, benzodiazepines, amiodarone, thyrotoxicosis, arterial hypertension

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Safronko A.V., Maklyakov Y.S., Lepyavka S.V., Demidov I.A., Demidova A.A., Dubatova I.V. Pharmacological Optimization of Premedication to Reduce the Risk of Cardiovascular Complications. *Journal Biomed.* 2021;17(3E):183–191. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-183-191>

Submitted 20.04.2021

Revised 03.06.2021

Published 20.10.2021

Введение

При нейрохирургических операциях на спинном и головном мозге у больных артериальной гипертензией (АГ) с нарушениями ритма сердца, длительно принимающих амиодарон, предоперационная подготовка должна проводиться с учётом наличия или отсутствия дисфункции щитовидной железы. При показаниях к срочному оперативному вмешательству невозможность отмены амиодарона объясняется необходимостью первичной или вторичной профилактики фатальных желудочковых нарушений ритма сердца [8]. В такой сложной клинической ситуации серьёзную опасность представляют именно кардиальные эффекты избытка тиреоидных гормонов, вариабельность системной гемодинамики, лабильность психики пациента, проявляющиеся в послеоперационный период [3].

Одним из способов устранения риска развития непредсказуемых сердечно-сосудистых и психических реакций непосредственно после операции у такой категории больных является грамотная фармакологическая организация премедикации [4, 6]. Использование бензодиазепинов длительного действия наряду с препаратами магния на этапе премедикации может обеспечить снотворное, седативное, анксиолитическое, центральное и периферическое миорелаксирующее действие наряду с усилением стабильности гемодинамики в послеоперационном периоде [7]. Между

тем при подготовке больных к операциям на фоне тиреотоксикоза чаще используют бензодиазепины короткого действия, обеспечивающие более глубокую и быструю седацию [2].

Эффективность предоперационной подготовки больных АГ с нарушениями ритма сердца, длительно принимающих амиодарон, должна основываться не только на принципах анестезиологии и реаниматологии, но и с фармакологических позиций необходимости снижения риска опасных побочных сердечно-сосудистых реакций в послеоперационном периоде [9].

Цель работы — снизить риск развития сердечно-сосудистых осложнений у больных артериальной гипертензией и нарушениями ритма сердца на фоне амиодарон-индуцибельной дисфункции щитовидной железы после нейрохирургических операций за счёт фармакологической оптимизации премедикации.

Материалы и методы

При проведении исследования формировали клиническую группу из 46 больных с АГ, нарушениями ритма сердца и амиодарон-ассоциированным тиреотоксикозом I типа. Пациенты получали амиодарон в суточной дозе 200 мг. Длительность тиреотоксикоза I типа в среднем была $3,1 \pm 0,3$ года на фоне приёма амиодарона в течение в среднем $6,4 \pm 0,4$ года. Амиодарон-

ассоциированный тиреотоксикоз I типа развивался на фоне предшествующей патологии щитовидной железы: узловой и многоузловой зоб, диффузный токсический зоб. Пациенты с тиреотоксикозом получали стандартную терапию тиреостатиком — тиамазол в поддерживающей концентрации в среднем 10 мг/сут. после ударной начальной дозы 30–40 мг/сут. До операции был достигнут антиаритмический эффект и подобрана оптимальная доза и режим введения амиодарона. За сутки до операции и в первые 3 сут. после операции амиодарон отменяли.

Пациенты в зависимости от схемы премедикации делили на три подгруппы: в 1-й подгруппе (n=16) премедикацию осуществляли диазепамом (3 дня перед операцией на ночь перорально 5–10 мг и за 1 ч до наркоза — 0,5% р-р в дозе 0,15 мг/кг внутримышечно). Перед операцией дополнительно вводили магния сульфат, 25% р-р 5 мл; во 2-й подгруппе (n=15) пациенты получали диазепам на ночь перорально (5–10 мг) и за 1 ч до наркоза в дозе 0,15 мг/кг внутримышечно; в 3-й подгруппе (n=15) премедикацию проводили мидазоламом, 0,5% р-р в дозе 0,07–0,1 мг/кг внутримышечно, за 40–60 мин до наркоза. Критериями включения пациентов в клиническую группу явились: артериальная гипертензия 2-й степени, риск 4, длительностью 10 и более лет, которая предшествовала амиодарон-ассоциированному тиреотоксикозу; комбинированная антигипертензивная терапия β-адреноблокаторами и антагонистами кальциевых каналов, аритмии — желудочковые и наджелудочковые, пароксизмальные суправентрикулярные тахикардии, рефрактерные к терапии антиаритмическими препаратами, кроме амиодарона; приём амиодарона для лечения аритмии; амиодарон-ассоциированный тиреотоксикоз I типа (снижение уровня тиреотропного гормона менее 0,1 мМЕ/л наряду с по-

вышением уровня свободного тироксина и трийодтиронина выше верхней границы нормы); подготовка к нейрохирургической операции, не предполагающая длительной плановой подготовки. Критерии исключения пациентов из основной и клинической групп: ИБС, нестабильная стенокардия; дилатационная кардиомиопатия, гемодинамически значимые пороки сердца, хроническая сердечная недостаточность; инсульт или инфаркт миокарда за 6 мес. до включения в исследование; амиодарон-ассоциированный тиреотоксикоз II типа; декомпенсация почечной или печёночной недостаточности.

В 1-й подгруппе средний возраст составил $57,9 \pm 1,72$ года (медиана — 61 год), во 2-й подгруппе — $60,9 \pm 2,04$ года (медиана — 62 года) и в 3-й подгруппе — $59,8 \pm 2,56$ года (медиана — 60 лет). Мужчин и женщин в 1-й подгруппе было 11 (69%) и 5 (31%) соответственно, во 2-й подгруппе — 9 (60%) и 6 (40%), в 3-й подгруппе — 10 (67%) и 5 (33%).

До и после операции комбинированная антигипертензивная терапия не отменялась.

Всем больным проводились нейрохирургические операции в связи с посттравматическими дефектами черепа, объёмными образованиями головного мозга, дегенеративно-дистрофическими заболеваниями позвоночника, что не предполагало задержек с проведением операции и длительной соматической и эндокринологической подготовки пациентов к ней.

Оценка уровня седации по шкале Ramsay в послеоперационном периоде в отделении интенсивной терапии проводилась ежедневно до стабилизации состояния.

При оценке глубины седации с помощью монитора А-2000ХР («Aspect Medical Systems», США) регистрировали сигнал ЭЭГ, после чего рассчитывали биспектральный индекс (BIS). Данный показатель позволял определить степень угнетения

функции головного мозга или глубину седации в режиме реального времени.

Для изучения уровня тревожности и депрессии использовали Госпитальную шкалу тревоги (HADSa) и депрессии (HADSd) (Hospital Anxiety and Depression Scale, HADS).

Для суточного мониторинга АД (СМАД) использовали осциллометрический метод и аппарат «BPlab» («Петр Телегин», Россия). В дневной диапазон суток (7^{00} – 23^{00}) АД фиксировали последовательно каждые 15 мин, а в ночной диапазон (23^{00} – 7^{00}) — каждые 30 мин.

Суточное ЭКГ-мониторирование осуществляли с использованием восьмиканального кардиомонитора «Кардиотехника-04» (ЗАО «Инкарт», Россия). При анализе желудочковых экстрасистол использовали классификацию по В. Lown (по градации тяжести).

Проведение суточного мониторинга АД и ЭКГ, оценки тревожности в трёх подгруппах позволило оценить эффективность различных способов премедикации для снижения риска опасных сердечно-сосудистых реакций на послеоперационном этапе.

Статистическая обработка результатов исследования осуществлялась с помощью программы Statistica 12.0 («StatSoft», США). Для анализа и сравнения качественных показателей использовали критерий χ^2 , а для количественных — критерии дисперсионного анализа Краскела — Уоллиса и Манна — Уитни. Нормальность распределения проверяли с помощью теста Шапиро — Уилка. Уровень статистической значимости отличия между показателя принимали при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Оптимизация этапа премедикации является актуальной проблемой медицины и клинической фармакологии, поскольку имеет целью профилактику неблагоприятных и непредсказуемых изменений функ-

ционального состояния больного на этапе операции и раннем послеоперационном периоде [5]. Оптимизация премедикации пациентов с нейрохирургической патологией с учётом гемодинамического и вегетативного статуса, уровня нейровегетативного контроля системной гемодинамики и ритмогенеза в сердце при длительно повышенном АД позволит улучшить результаты лечения и уменьшить сроки пребывания нейрохирургических больных в реанимационном отделении и стационаре. Степень разработанности темы по изучению эффективности пролонгированной премедикации пациентов с артериальной гипертензией и фармако-ассоциированным тиреотоксикозом для снижения сердечно-сосудистых осложнений в послеоперационный период — низкая. В литературе имеются единичные публикации об особенностях премедикации больных с тиреотоксикозом при выполнении операций на щитовидной железе [1]. При этом изучаются аспекты премедикации при плановой подготовке пациента к операции.

Исходно до операции в трёх подгруппах пациентов параметры системной гемодинамики были скорректированы с помощью антигипертензивных средств. Статистически значимых различий между группами выявлено не было (табл. 1).

Используемые в премедикацию бензодиазепины сочетаются с β -адреноблокаторами и антагонистами кальциевых каналов, что позволяло не отменять антигипертензивную терапию у больных трёх подгрупп до и после операции. В 1-й подгруппе пациентов в первые трое суток после операции среднесуточное систолическое АД было ниже по сравнению со 2-й подгруппой ($p=0,025$) ($130,5 \pm 2,4$ против $140,4 \pm 3,1$ мм рт. ст.) и 3-й подгруппой ($130,5 \pm 2,4$ против $142,7 \pm 3,3$ мм рт. ст.) при отсутствии межгрупповых различий диастолического АД между группами ($p=0,51$) (табл. 1).

Таблица 1. Динамика среднесуточных, дневных и ночных параметров суточного мониторинга АД ($M \pm m$) в подгруппах пациентов после операции (на 3-и сут.) в зависимости от тактики премедикации

Table 1. Dynamics of average daily, day-time and night-time parameters of blood pressure ($M \pm m$) in subgroups of patients after surgery (on the 3rd day), depending on the tactics of premedication

Группы Показатели		1-я подгруппа (n=16)	2-я подгруппа (n=15)	3-я подгруппа (n=15)	p_{min}
САД24, мм рт. ст.	до/после операции	137,2±3,1 130,5±2,4	135,6±2,6 140,4±3,1*	134,8±2,9 142,7±3,3*	0,48 0,025
$p_{\text{до-после}}$		0,042	0,087	0,039	
ДАД24, мм рт. ст.	до/после операции	82,1±2,3 81,9±2,0	81,4±2,5 82,6±1,9	83,0±1,8 85,7±2,4	0,35 0,51
$p_{\text{до-после}}$		0,84	0,72	0,58	
ЧСС24, уд. в мин	до/после операции	80,4±1,6 73,5±1,8	81,5±1,3 80,9±2,2*	82,7±1,9 84,9±2,1* ^o	0,88 0,035
$p_{\text{до-после}}$		0,027	0,71	0,46	
САД днём, мм рт. ст.	до/после операции	139,5±3,2 133,7±2,8	141,6±4,0 144,1±3,7*	138,1±2,7 145,8±3,1*	0,27 0,033
$p_{\text{до-после}}$		0,05	0,26	0,046	
ДАД днём, мм рт. ст.	до/после операции	86,5±2,8 82,4±2,4	84,9±3,3 85,5±2,6	87,5±2,9 93,3±2,5* ^o	0,75 0,048
$p_{\text{до-после}}$		0,58	0,76	0,049	
ЧСС днём, уд. в мин	до/после операции	83,6±1,8 76,1±2,0	84,3±1,7 84,8±2,1*	85,1±1,5 88,5±2,3* ^o	0,94 0,042
$p_{\text{до-после}}$		0,036	0,99	0,92	
САД ночью, мм рт. ст.	до/после операции	128,6±2,7 127,1±2,5	132,5±3,1 138,9±2,8*	130,4±3,4 140,2±3,1*	0,56 0,031
$p_{\text{до-после}}$		0,87	0,049	0,021	
ДАД ночью, мм рт. ст.	до/после операции	80,1±2,6 78,4±2,2	79,2±2,9 80,1±3,1	82,4±2,5 84,8±2,3	0,91 0,58
$p_{\text{до-после}}$		0,94	0,92	0,85	
ЧСС ночью, уд. в мин	до/после операции	62,6±1,5 64,2±1,4	64,7±1,3 65,8±1,2	68,4±1,4 67,9±1,6	0,044 0,87
$p_{\text{до-после}}$		0,53	0,64	0,72	

Примечание: $p_{\text{до-после}}$ — доверительная вероятность различия показателей до и после операции; p_{min} — доверительная вероятность результатов дисперсионного анализа сравнения показателей трех групп; * — статистически значимое различие при попарном сравнении по сравнению с 1-й подгруппой; ^o — по сравнению со 2-й подгруппой при $p < 0,05$. 1-я подгруппа — пролонгированная премедикация диазепамом, 2-я подгруппа — премедикация диазепамом за сутки до операции, 3-я подгруппа — премедикация мидазоламом перед наркозом. САД — систолическое артериальное давление, ДАД — диастолическое артериальное давление, САД24 — среднесуточное систолическое артериальное давление, ДАД24 — среднесуточное диастолическое артериальное давление.

Note: $p_{\text{до-после}}$ — confidence level of the difference between the indicators before and after the operation; p_{min} — confidence level of the analysis of variance when comparing the indicators of three groups; * — statistically significant difference in pairwise comparison compared with the 1st subgroup; ^o — in comparison with the 2nd subgroup at $p < 0,05$; n/o — post-operative. Subgroup 1 — prolonged premedication with diazepam; subgroup 2 — premedication with diazepam one day before surgery; subgroup 3 — premedication with midazolam before anesthesia. САД — systolic blood pressure, ДАД — diastolic blood pressure, САД24 — average daily systolic blood pressure, ДАД24 — average daily diastolic blood pressure.

Таким образом, снижение нагрузки давлением и усиление стабильности параметров системной гемодинамики имели место в 1-й подгруппе больных, а во 2-й подгруппе пациентов нагрузка давлением повыша-

лась при ограничении перепадов значений АД за сутки.

При суточном мониторинговании ЭКГ после операции частота суправентрикулярных экстрасистол была у меньшего

числа больных 1-й подгруппы (37,5%) и чаще встречалась во 2-й (60%) и 3-й (80%) подгруппах. Частота одиночных желудочковых экстрасистол встречалась у меньшего числа пациентов 1-й подгруппы (37,5%) по сравнению со 2-й (46,7%) и 3-й (60%) подгруппами. Частота групповых желудочковых экстрасистол, пробежек желудочковой тахикардии в подгруппах пациентов до и после операции не различалась. После операции по сравнению с исходным уровнем частота суправентрикулярных экстрасистол, одиночных желудочковых экстрасистол, групповых желудочковых экстрасистол, пробежек желудочковой тахикардии

во всех подгруппах статистически значимо не различалась.

Если частотные количественные характеристики экстрасистол за сутки по итогам мониторингования ЭКГ в подгруппах пациентов после операции не изменялись, то количественные характеристики динамично перестраивались в различных направлениях в зависимости от тактики премедикации (табл. 2).

В 1-й подгруппе после операции количество суправентрикулярных экстрасистол за сутки (213,7±0,4); одиночных желудочковых экстрасистол (123,6±8,2) и групповых желудочковых экстрасистол (11,3±1,4) было наименьшим, а в 3-й подгруппе —

Таблица 2. Динамика количественных характеристик экстрасистол за сутки по итогам мониторингования ЭКГ в подгруппах пациентов после операции (на 3-и сут.) в зависимости от тактики премедикации

Table 2. Dynamics of quantitative characteristics of extrasystoles per day according to the results of ECG monitoring in the subgroups of patients after surgery (on the 3rd day), depending on the tactics of premedication

Группы Показатели		1-я подгруппа (n=16)	2-я подгруппа (n=15)	3-я подгруппа (n=15)	$p_{\text{мн}}$
Количество суправентрикулярных экстрасистол за сутки	до/после операции	478,3±11,2 213,7±0,4	501,9±12,8 457,6±11,9*	456,7±11,7 642,5±10,3 ^o	0,37 0,01
	$P_{\text{до-после}}$	0,001	0,08	0,031	
Количество одиночных желудочковых экстрасистол	до/после операции	189,2±9,5 123,6±8,2	195,3±8,5 178,4±9,1*	201,5±9,0 318,6±14,6 ^o	0,85 0,02
	$P_{\text{до-после}}$	0,024	0,24	0,027	
Количество групповых желудочковых экстрасистол	до/после операции	18,9±2,3 11,3±1,4	19,6±1,5 16,5±1,0*	21,3±1,8 30,7±1,1 ^o	0,28 0,01
	$P_{\text{до-после}}$	0,013	0,045	0,048	
ЧСС24, уд. в мин	до/после операции	80,4±1,6 73,5±1,8	81,5±1,3 80,9±2,2*	82,7±1,9 84,9±2,1 ^o	0,88 0,035
	$P_{\text{до-после}}$	0,027	0,71	0,46	

Примечание: $p_{\text{до-после}}$ — доверительная вероятность различия показателей до и после операции; $p_{\text{мн}}$ — доверительная вероятность результатов дисперсионного анализа сравнения показателей трех групп; * — статистически значимое различие при попарном сравнении по сравнению с 1-й подгруппой; ^o — по сравнению со 2-й подгруппой при $p < 0,05$. 1-я подгруппа — пролонгированная премедикация диазепамом, 2-я подгруппа — премедикация диазепамом за сутки до операции, 3-я подгруппа — премедикация мидазоламом перед наркозом.

Note: $p_{\text{до-после}}$ — confidence level of the difference between the indicators before and after the operation; $p_{\text{мн}}$ — confidence level of the analysis of variance when comparing indicators of 3 groups; * — statistically significant difference in pairwise comparison compared with the 1st subgroup; ^o — in comparison with the 2nd subgroup at $p < 0.05$; n/o — postoperative. Subgroup 1 — prolonged premedication with diazepam; subgroup 2 — premedication with diazepam one day before surgery; subgroup 3 — premedication with midazolam before anesthesia.

наибольшим ($642,5 \pm 10,3$; $318,6 \pm 14,6$; $30,7 \pm 1,1$ соответственно). После операции, по сравнению с исходным дооперационным уровнем, в 1-й подгруппе количество суправентрикулярных экстрасистол, одиночных и групповых желудочковых экстрасистол снижалось, соответственно, на $266,1 \pm 1,6$ ($p=0,001$), $64,2 \pm 3,5$ ($p=0,024$) и $7,5 \pm 0,4$ ($p=0,013$). Во 2-й подгруппе статистически значимо снижалось только количество групповых желудочковых экстрасистол ($p=0,045$). В 3-й подгруппе количество суправентрикулярных экстрасистол, одиночных и групповых желудочковых экстрасистол повышалось, соответственно, на $184,5 \pm 9,5$ ($p=0,031$), $117,5 \pm 2,9$ ($p=0,027$) и $9,3 \pm 0,7$ ($p=0,048$).

Таким образом, в 1-й подгруппе нарушения ритма сердца после операции встречались реже, во 2-й подгруппе структура нарушений ритмогенеза в сердце практически не изменялась, а в 3-й подгруппе наблюдался неблагоприятный тренд повышения частоты суправентрикулярных, одиночных и групповых желудочковых экстрасистол.

Адекватность уровня седации после операции оценивали по шкале Ramsay. Через 1 ч после операции у больных всех трёх подгрупп уровень седации был 6, что соответствовало состоянию, когда пациент спит и не реагирует на раздражители. Через 3–6 ч после операции во всех трёх подгруппах преобладал уровень седации 2 и 3 балла. Через 12 ч уровни седации были сходными и составляли 1–2. Таким образом, в трёх подгруппах после операции седация была сходной.

Во всех подгруппах, вне зависимости от типа премедикации, использование бензодиазепинов сопровождалось отсутствием прироста уровня тревоги после операции (табл. 2). Биспектральный индекс, восстановление активности головного мозга через 12 ч после операции в клинических подгруппах не различались.

Следовательно, применение комплексной пролонгированной премедикации бензодиазепинами длительного действия и препаратами магния способствовало нивелированию в послеоперационный период вегетативных сердечно-сосудистых последствий амиодарон-ассоциированного тиреотоксикоза I типа, а также нарушений ритмогенеза в сердце.

Таким образом, индивидуальная тактика преднаркозной подготовки пациентов с артериальной гипертензией, получающих β -адреноблокаторы и антагонисты кальциевых каналов в качестве антигипертензивной терапии, и нарушениями ритма сердца, длительно принимающих амиодарон, помогает снизить риск опасных побочных сердечно-сосудистых реакций в раннем послеоперационном периоде. Длительный приём амиодарона более пяти лет в дозе 200 мг/сут. позволял достигнуть антиаритмического эффекта, но сопровождался развитием тиреотоксикоза I типа. Дисфункция щитовидной железы, а также отмена амиодарона непосредственно до и после операции повышали риск развития нарушений ритма сердца и подъёма АД в послеоперационный период, усиления тревожных реакций. Пролонгированная премедикация бензодиазепинами длительного действия и препаратами магния сопровождалась благоприятным влиянием в первые 3 сут. после операции одновременно на сердечно-сосудистую систему и тревожно-депрессивные проявления: имело место снижение частоты нарушений ритмогенеза в сердце, ЧСС, систолического АД на фоне отсутствия изменений уровней тревоги и депрессии. Использование бензодиазепинов короткого действия в премедикацию не сопровождалось усилением тревоги и депрессии в ранний послеоперационный период, но не предотвращало неблагоприятных сердечно-сосудистых реакций.

Выводы

1. Для снижения риска нарушений ритма сердца и повышения АД в послеоперационный период больным артериальной гипертензией, с нарушениями ритма сердца и амиодарон-ассоциированным тиреотоксикозом I типа премедикацию рекомендуется осуществлять бензодиазепинами пролонгированным курсом (диазепам — 3 дня перед операцией на ночь перорально 5–10 мг и за 1 ч до наркоза, 0,5% р-р в дозе 0,15 мг/кг внутримышечно) в комплексе с введением р-ра магния сульфата 25% 5 мл.

2. При резком ограничении сроков подготовки больного к операции назначение бензодиазепинов длительного действия (диазепам на ночь перорально 5–10 мг

и за 1 ч до наркоза в дозе 0,15 мг/кг внутримышечно) имеет преимущества перед бензодиазепинами короткого действия (мидазолам, 0,5% р-р в дозе 0,07–0,1 мг/кг внутримышечно за 40–60 мин до наркоза) ввиду профилактики развития нарушений ритма сердца и повышения АД в ранний послеоперационный период.

3. Пролонгированная премедикация бензодиазепинами длительного действия и препаратами магния у больных артериальной гипертензией с амиодарон-ассоциированным тиреотоксикозом I типа нивелирует неблагоприятные последствия на сердечно-сосудистую систему амиодарон-ассоциированной дисфункции щитовидной железы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Бадикова К.А., Женило В.М., Демидова А.А., Лебедева Е.А., Бадиков В.В. *Способ снижения психоэмоционального напряжения перед оперативным вмешательством на щитовидной железе путём индивидуального подбора премедикации*. Патент на изобретение RU 2724483 C1, 2020. [Badikova K.A., Zhenilo V.M., Demidova A.A., Lebedeva E.A., Badikov V.V. *Sposob snizheniya psikhoeotsional'nogo napryazheniya pered operativnym vmeshatel'stvom na shchitovidnoy zheleze putem individual'nogo podbora premedikatsii* [A method of reducing psycho-emotional stress before surgery on the thyroid through individual premedication selection]. Invention patent RU 2724483 C1, 2020. (In Russian)].
2. Бадикова К.А., Женило В.М. Влияние седативного компонента премедикации, достигаемого применением гидроксизина гидрохлорида, на психоvegetативный и гормональный статус у пациентов с заболеваниями щитовидной железы. *Вестник анестезиологии и реаниматологии*. 2017;14(1):24–28. [Badikova K.A., Zhenilo V.M. *Vliyanie sedativnogo komponenta premedikatsii, dostigaemogo primeneniem gidroksizina gidrokhlorida, na psikhovegetativnyy i gormonal'nyy status u patsientov s zabolevaniyami shchitovidnoy zhelezy* [The effect of the sedative component of premedication achieved by the use of hydroxyzine hydrochloride on psychovegetative and hormonal status in patients with thyroid diseases]. *Vestnik anesteziologii i reanimatologii* [Anesthesiology and Resuscitation Bulletin]. 2017;14(1):24–28. (In Russian)].
3. Воробьев К.П., Митрохин К.В. Изменения вегетативной регуляции на этапах предоперационной подготовки и после интубации трахеи у пациентов общехирургического профиля. *Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия Медицина*. 2018;13(1):5–15. [Vorobiev K.P., Mitrokhin K.V. *Izmeneniya vegetativnoy regulyatsii na etapakh predoperatsionnoy podgotovki i posle intubatsii trakhei u patsientov obshchekhirurgicheskogo profilya* [Changes in autonomic regulation at the stages of preoperative preparation and after tracheal intubation in general surgical patients]. *Vestnik Sankt-Peterburgskogo universiteta. Seriya Meditsina* [St. Petersburg University Bulletin. Series Medicine]. 2018;13(1):5–15. (In Russian)]. DOI: 10.21638/11701/spbu11.2018.101.
4. Китиашвили И.З., Сало А.А., Китиашвили Д.И., Войнова В.И. Выбор оптимального компонента премедикации в хирургической практике. *Мат-лы науч.-образ. конф. «Актуальные вопросы и инновационные технологии в анестезиологии и реаниматологии»*. Общественная организация «Человек и его здоровье». 2018:80–81. [Kitiashvili I.Z., Salo A.A., Kitiashvili D.I., Voinova V.I. *Vybor optimal'nogo komponenta premedikatsii v khirurgicheskoy praktike* [Selection of the optimal component of premedication in the surgical practice]. *Mat-ly nauch.-образ. конф. "Aktual'nye voprosy i innovatsionnye tekhnologii v anesteziologii i reanimatologii"* [Proceedings of the scientific and educational conference "Topical issues and innovative technologies in anesthesiology and resuscitation"]. *Obshchestvennaya organizatsiya "Chelovek i ego zdorov'e"* Publ. 2018:80–81. (In Russian)].
5. Орехова Е.С., Гуляев Д.А., Саввина И.А. Персонализированный подход к выбору премеди-

- кации у пациентов нейрохирургического профиля. *Анестезиология и реаниматология*. 2019;3:79–89. [Orekhova E.S., Gulyaev D.A., Savvina I.A. Personalized approach to the choice of premedication in neurosurgical patients]. *Anesteziologiya i reanimatologiya [Anesthesiology and Resuscitation]*. 2019;3:79–89. (In Russian)]. DOI: 10.17116/anaesthesiology201903179.
6. Jafar M.F., Khan F.A. Frequency of preoperative anxiety in Pakistani surgical patients. *J. Pak. Med. Assoc.* 2009;59:359–363.
7. Lahkar B., Dutta K. Benzodiazepine premedication in general anaesthesia: A clinical comparative study. *Int. J. Clin. Trials*. 2019;6(2):45–51. DOI: 10.18203/2349-3259.ijct20190983.
8. Laina A., Karlis G., Liakos A., Georgiopoulos G., Oikonomou D., Kouskouni E., Chalkias A., Xanthos T. Amiodarone and cardiac arrest: Systematic review and meta-analysis. *Int. J. Cardiol.* 2016;221:780–788. DOI: 10.1016/j.ijcard.2016.07.138.
9. Ortiz M., Martin A., Arribas F., Coll-Vinent B., Del Arco C., Peinado R, Almendral J., PROCAMIO Study Investigators. Randomized comparison of intravenous procainamide vs. intravenous amiodarone for the acute treatment of tolerated wide QRS tachycardia: The PROCAMIO study. *Eur. Heart J.* 2017;38(17):1329–1335. DOI: 10.1093/eurheartj/ehw230.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Сафроненко Андрей Владимирович, д.м.н., доц., ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России; e-mail: andrejsaf@mail.ru

Макляков Юрий Степанович, д.м.н., проф., ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России; e-mail: maklus005@gmail.com

Лепявка Сергей Владимирович, ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России; e-mail: lepyvka@rambler.ru

Демидов Игорь Анатольевич*, к.м.н., ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России; e-mail: demidova-66@yandex.ru

Демидова Александра Александровна, к.м.н., ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России; e-mail: alald@inbox.ru

Дубатова Ирина Владимировна, к.м.н., доц., ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России; e-mail: tory15@mail.ru

Andrey V. Safronenko, Cand. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Rostov State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia; e-mail: andrejsaf@mail.ru

Yuri S. Maklyakov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Rostov State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia; e-mail: maklus005@gmail.com

Sergey V. Lepyvka, Rostov State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia; e-mail: lepyvka@rambler.ru

Igor A. Demidov*, Cand. Sci. (Med.), Rostov State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia; e-mail: demidova-66@yandex.ru

Aleksandra A. Demidova, Cand. Sci. (Med.), Rostov State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia; e-mail: alald@inbox.ru

Irina V. Dubatova, Cand. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Rostov State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia; e-mail: tory15@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

