

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

ISSN 2074-5982 (print) | ISSN 2074-5982 (on-line)

БИОМЕДИЦИНА

SCIENTIFIC JOURNAL

BIOMEDICINE

Том (Vol.) 15
2019

1



Уважаемые коллеги!

Приглашаем Вас принять участие в **ежегодной научно-практической конференции «Биомедицина и биомоделирование»**, которая будет проводиться **21-22 мая 2019 г.** в Научном центре биомедицинских технологий ФМБА России по адресу:

143442, Московская обл., Красногорский р-н, пос. Светлые горы, владение 1
тел.: +7 (495) 561-52-64, факс: +7 (495) 561-52-73
e-mail: scbmt@yandex.ru

Предполагаемые темы для формирования программы Конференции:

1. **Лабораторные животные** (модели животных в биомедицинских исследованиях, биоэтические нормы и принципы в экспериментальной работе, новые методы оценки функциональных состояний животных, лабораторные животные в современных фармакологических и токсикологических исследованиях, животные-модели и модели животных в сравнительных биологических исследованиях, новые технологии содержания, требования GLP).
2. **Альтернативное и биологическое моделирование в биомедицинских исследованиях** (биологические и клеточные, математические, физико-химические модели, животные-модели).
3. **Биомедицинская безопасность** (безопасность нанобиотехнологических средств, клеточных технологий, иммунобиологических препаратов, лекарственная токсикология и безопасность фармакологических средств и фармацевтических субстанций).
4. **Новые биомедицинские технологии.**
5. **Методы биомедицинских исследований.**
6. **Работоспособность и выносливость в спортивной биомедицине.**
7. **Биомоделирование в интересах клинической фармакологии.**

Время для доклада на пленарном заседании: 20 мин, на секциях – 10 мин. Возможно представление стендовых докладов. Просьба к участникам выслать материалы докладов с указанием фамилии, имени, отчества (полностью), учреждения и названия доклада до 1 мая 2019 года.

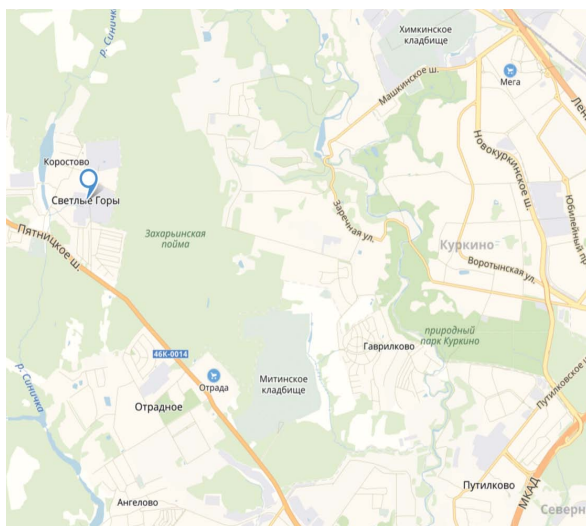
СХЕМА ПРОЕЗДА:

Адрес: **143442, Московская обл., Красногорский р-н, пос. Светлые горы, владение 1.**

Проезд по Пятницкому шоссе от станции метро «Тушинская» на автобусе 575 или маршрутном такси 460 до остановки «Марьино-Знаменское», далее пешком до Центра через поселок.

От станции метро «Митино» или «Пятницкое шоссе» на автобусе 575, маршрутном такси 575, 460, 707 до остановки «Марьино-Знаменское», далее пешком до Центра через поселок, на автобусе 32 до остановки Светлые горы.

На автомобиле: по Пятницкому шоссе (6 км от МКАД) до поворота на Светлые горы, мимо пруда, до магазина, после него поворот налево между двух прудов по дамбе прямо до Центра.



ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий
Федерального медико-биологического агентства России»

БИОМЕДИЦИНА

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Издается с 2005 г.
4 выпуска в год

2019, Том 15, № 1

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

BIOMEDICINE

SCIENTIFIC JOURNAL

Published since 2005.
Quarterly.

2019, Vol. 15, № 1

Научный журнал «Биомедицина» основан в 2005 году Научным центром биомедицинских технологий Российской академии медицинских наук (в настоящее время — ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства»). Журнал издается на русском и английском языках. В журнале публикуются исследования по новым биомедицинским технологиям, спортивной медицине, новым регуляторным пептидам, спортивному питанию, лабораторным животным, методам биомедицинских исследований, генетике лабораторных животных, фармакологии и клинической фармакологии, восстановительной и спортивной медицине, лечебной физкультуре. Журнал предназначен для ученых, аспирантов, преподавателей и студентов вузов, специалистов, работающих в области биологии, ветеринарии, медицины и биомедицины. В журнале опубликованы статьи авторов из 119 различных организаций (медицинских и биологических вузов, НИИ, центров повышения квалификации специалистов), география организаций включает в себя Москву, Санкт-Петербург, Астрахань, Урал, Саратов, Кабардино-Балкарию, Томск, Дальний Восток, Нидерланды.

■ Главный редактор

Каркищенко Николай Николаевич, доктор медицинских наук, профессор, член-корр. РАН, академик Российской академии ракетных и артиллерийских наук, академик Международной академии астронавтики (Париж), научный руководитель ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства» (пос. Светлые горы, Красногорский район, Московская область, Россия)

■ Заместитель главного редактора

Каркищенко Владислав Николаевич, доктор медицинских наук, профессор, директор ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства» (пос. Светлые горы, Красногорский район, Московская область, Россия)

■ Ответственный секретарь

Станкова Наталия Владимировна, кандидат биологических наук, заведующая лабораторией спортивной медицины и экстремальных состояний, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства» (пос. Светлые горы, Красногорский район, Московская область, Россия)

■ Редакционный совет

Анохин Константин Владимирович, доктор медицинских наук, профессор, член-корр. РАН, руководитель отдела нейронаук НИЦ «Курчатовский институт» (Москва, Россия)

Ачкасов Евгений Евгеньевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой

спортивной медицины и медицинской реабилитации, ФГАОУ ВО «Первый Московский медицинский государственный университет им. И. М. Сеченова» Минздрава России (Москва, Россия)

Баранов Виктор Михайлович, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, заместитель генерального директора — директор НИИ космической медицины ФНЦ Федерального медико-биологического агентства (Москва, Россия)

Берзин Игорь Александрович, доктор медицинских наук, профессор, заслуженный врач РФ, начальник Управления организации научных исследований Федерального медико-биологического агентства (Москва, Россия)

Быков Анатолий Тимофеевич, доктор медицинских наук, профессор, член-корр. РАН, заслуженный врач РФ, заведующий кафедрой восстановительной медицины, физиотерапии, мануальной терапии, ЛФК и спортивной медицины ФПК и ППС, «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России (Сочи, Россия)

Влахос Витан, доктор медицинских наук (Болгария), профессор, академик Болгарской академии наук и искусств, консультант по клинической фармакологии и терапии, Медицинский Университет (София, Болгария)

Воевода Михаил Иванович, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, директор, Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины — филиал государственного бюджетного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (Новосибирск, Россия)

БИОМЕДИЦИНА

Biomeditsina

Гасанов Мелик Тофикович, кандидат медицинских наук, доцент, заместитель директора по научной работе, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства» (пос. Светлые горы, Краснотуркменский район, Московская область, Россия)

Дыгай Александр Михайлович, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки, заместитель академика-секретаря – руководитель секции медицинских наук РАН, директор, заведующий отделом патофизиологии и регенеративной медицины, ФГБУ «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга» (Томск, Россия)

Зефилов Андрей Львович, доктор медицинских наук, профессор, член-корр. РАН, заслуженный деятель науки Российской Федерации и Республики Татарстан, заведующий кафедрой нормальной физиологии, декан лечебного факультета ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России (Казань, Россия)

Кузденбаева Раиса Салмаганбетовна, доктор медицинских наук, профессор, академик Национальной академии наук Казахстана, член-корр. Академии медицинских наук Республики Казахстан и Академии профилактической медицины Республики Казахстан, начальник управления фармакологической экспертизы, «Национальный центр экспертизы лекарственных средств, изделий медицинского назначения и медицинской техники Минздрава Республики Казахстан (Астана, Казахстан)

Кукес Владимир Григорьевич, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, профессор кафедры клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней, ФГАОУ ВО «Первый Московский медицинский государственный университет им. И. М. Сеченова» Минздрава России (Москва, Россия)

Макляков Юрий Степанович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой фармакологии и клинической фармакологии, Ростовский государственный медицинский университет (Ростов-на-Дону, Россия)

Матишов Геннадий Григорьевич, доктор географических наук, профессор, академик РАН, член Президиума РАН, научный руководитель Южного научного центра РАН, председатель Президиума ЮНЦ РАН (Ростов-на-Дону, Россия)

Мирошников Анатолий Иванович, доктор химических наук, академик РАН, председатель Пущинского научного центра РАН, заместитель директора, ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН», председатель, «Пущинский научный центр РАН» (Москва, Россия)

Мурашёв Аркадий Николаевич, доктор биологических наук, профессор, заместитель директора, руководитель лаборатории биологических испытаний, филиал ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН» (Пущино, Московская область, Россия)

Оковитый Сергей Владимирович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой фармакологии и клинической фармакологии, ФГБУ ВО «Санкт-Петербургская химико-фармацевтическая академия» Минздрава России (Санкт-Петербург, Россия)

Пчелинцев Сергей Юрьевич, доктор медицинских наук, профессор, директор, ОАО «Институт инженерной иммунологии» (дер. Любучаны, Чеховский район, Московская область, Россия)

Раменская Галина Владиславовна, доктор фармацевтических наук, профессор, заведующая кафедрой фармацевтической и токсикологической химии, ФГАОУ ВО «Первый Московский медицинский государственный университет им. И. М. Сеченова» Минздрава России (Москва, Россия)

Решетов Игорь Владимирович, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, заведующий кафедрой онкологии, радиотерапии и пластической хирургии Института Профессионального образования ФГАОУ ВО «Первый Московский медицинский государственный университет им. И. М. Сеченова» Минздрава России (Москва, Россия)

Сычев Дмитрий Алексеевич, доктор медицинских наук, профессор, член-корр. РАН, проректор по развитию и инновациям, заведующий кафедрой клинической фармакологии и терапии, ФГБОУ ВО «Первая Московская медицинская академия непрерывного профессионального образования» (Москва, Россия)

Хритинин Дмитрий Федорович, доктор медицинских наук, профессор, член-корр. РАН, профессор кафедры психиатрии и наркологии ФГАОУ ВО «Первый Московский медицинский государственный университет им. И. М. Сеченова» Минздрава России (Москва, Россия)

БИОМЕДИЦИНА

Biomeditsina

Цыганков Борис Дмитриевич, доктор медицинских наук, профессор, член-корр. РАН, заведующий кафедрой психиатрии, наркологии и психотерапии ФПДО ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России (Москва, Россия)

Цысь Валентина Ивановна, доктор сельскохозяйственных наук, профессор, академик РАЕН, профессор кафедры зоотехнии ФГБОУ ВО «Смоленская государственная сельскохозяйственная академия» (Смоленск, Россия)

Ших Евгения Валерьевна, доктор медицинских наук, профессор, директор института профессионального образования, заведующая кафедрой клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней, ФГАОУ ВО «Первый Московский медицинский государственный университет им. И. М. Сеченова» Минздрава России (Москва, Россия)

Шустов Евгений Борисович, доктор медицинских наук, профессор, академик РАЕН, профессор кафедры фармакологии и клинической фармакологии, ФГОУ ВО «Санкт-Петербургская химико-фармацевтическая академия» Минздрава России, главный научный сотрудник, ФГБУН «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства» (Санкт-Петербург, Россия)

Группа предварительной экспертизы редакционного совета ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства» (пос. Светлые горы, Красногорский район, Московская область, Россия)
Болотских Любовь Александровна (гнотобиология), кандидат сельскохозяйственных наук, заведующая лабораторией гнотобиологии

Люблинский Станислав Людвикович (биотехнология), кандидат биологических наук, заведующий лабораторией прикладной биотехнологии и биофармации

Матвеевко Елена Леонидовна (биоэкономика), кандидат экономических наук, доцент, Ученый секретарь

Ревякин Артем Олегович (биохимия, фармакотоксикология), кандидат биологических наук, заведующий лабораторией фармакомоделирования

Семенов Хызыр Хыйсаевич (лабораторные животные-биомодели), кандидат биологических наук, заведующий лабораторией биомоделей

Степанова Ольга Ивановна (клеточные технологии), кандидат биологических наук, заведующая лабораторией клеточных технологий

Фокин Юрий Владимирович (нейрофармакология, биомедицинская этология), кандидат биологических наук, заведующий лабораторией нейротехнологий

Чайванов Дмитрий Борисович (альтернативное и математическое моделирование), кандидат физико-математических наук, руководитель межведомственной лаборатории физических методов в биомедицине НИЦ «Курчатовский институт» (Москва, Россия), ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства» (пос. Светлые горы, Красногорский район, Московская область, Россия)

БИОМЕДИЦИНА

Biomeditsina

История издания журнала:	Журнал издается с 2005 г.
Периодичность:	4 выпуска в год
Префикс DOI:	10.33647
ISSN	2074-5982 (Print) 2074-5982 (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
Стоимость одного выпуска:	400 руб.
Условия распространения материалов:	Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0 License
Учредитель:	ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России» 143442, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, владение 1
Издатель:	ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России» 143442, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, владение 1
Редакция:	143442, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, владение 1 Тел.: +7 (495) 561-52-64 E-mail: scbmt@yandex.ru
Тираж:	3000 экземпляров
Типография:	ООО «БЕАН» 603003, Нижегородская обл, Нижний Новгород, ул. Баррикад, д. 1

BIOMEDICINE

Scientific journal “Biomedicine” was founded in 2005 by the Scientific Center for Biomedical Technology of the Russian Academy of Medical Sciences (now Scientific Center for Biomedical Technology of the Federal Medical and Biological Agency). The magazine is published in Russian and English languages. The journal publishes research on new biomedical technologies, sports medicine, new regulatory peptides, sports nutrition, laboratory animals, methods of biomedical research, genetics laboratory animals, pharmacology and clinical pharmacology, rehabilitation and sports medicine, physical therapy. The journal is intended for scientists, graduate students, teachers and university students, professionals working in the field of biology, veterinary medicine and biomedicine. The magazine published articles by authors from 119 different organizations (medical and biological universities, research institutes, centers of advanced training), geography organizations includes Moscow, St. Petersburg, Astrakhan, Ural, Saratov, Kabardino-Balkaria, Tomsk, the Far East, the Netherlands.

■ Editor-in-Chief

Nikolay N. Karkischenko, Doctor of Medical Sciences, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Academician of the Russian Academy of Rocket and Artillery Sciences, Academician of the International Academy of astronautics (Paris), Academic Director of the Scientific Center for Bio-medical Technology of the Federal Medical and Bio-logical Agency (Svetlye Gory, Krasnogorsk District, Moscow Region, Russia)

■ Deputy Editor-in-Chief

Vladislav N. Karkischenko, Doctor of Medical Sciences, Professor, Director of the Scientific Center for Biomedical Technology of the Federal Medical and Biological Agency (Svetlye Gory, Krasnogorsk District, Moscow Region, Russia)

■ Executive Secretary

Natalia V. Stankova, Candidate of Biological Sciences, Head of the Laboratory of Sports Medicine and Extreme States, Scientific Center for Biomedical Technology of the Federal Medical and Biological Agency (Svetlye Gory, Krasnogorsk District, Moscow Region, Russia)

■ Editorial Council

Evgeniy E. Achkasov, Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Sports Medicine and Rehabilitation, I. M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow, Russia)

Konstantin V. Anokhin, Doctor of Medical Sciences, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Head of the Department of Neuroscience, Kurchatov Institute (Moscow, Russia)

Viktor M. Baranov, Doctor of Medical Sciences, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Deputy General Director — Director of the Research Institute of Space Medicine, Federal Scientific and Clinical Center for Specialized Medical Assistance and Medical Technologies of the Federal Medical Biological Agency (Moscow, Russia)

Igor A. Berzin, Doctor of Medical Sciences, Professor, Honored Doctor of the Russian Federation, Head of the organization of scientific research Department, Federal Medical and Biological Agency (Moscow, Russia)

Anatoliy T. Bykov, Doctor of Medical Sciences, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Head of the Department of Rehabilitation Medicine, Physiotherapy, Manual Therapy, Physical Therapy and Sports Medicine of the Faculty of Advanced Training and Professional Retraining, Kuban State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sochi, Russia)

Aleksandr M. Dygay, Doctor of Medical Sciences, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, the deputy Academician-secretary - the Head of section of medical sciences, Director, Head of the Department of Pathophysiology and Regenerative Medicine, E.D. Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine (Tomsk, Russia)

Melik T. Gasanov, Candidate of Medical Sciences, Associate Professor, Deputy Director for Science, Scientific Center for Biomedical Technology of the Federal Medical and Biological Agency (Svetlye Gory, Krasnogorsk District, Moscow Region, Russia)

BIOMEDICINE

Dmitriy F. Khritinin, Doctor of Medical Sciences, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Professor of the Department of Psychiatry and Addiction, I. M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow, Russia)

Vladimir G. Kukes, Doctor of Medical Sciences, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Honored Scientist of the Russian Federation, Professor of the Department of Clinical Pharmacology and Propaedeutics of Internal Diseases, I. M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow, Russia)

Raisa S. Kuzdenbayeva, Doctor of Medical Sciences, Professor, Academician of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan, Corresponding Member of the Academy of Medical Sciences of the Republic of Kazakhstan and of the Academy of Preventive Medicine of the Republic of Kazakhstan, Head of the Pharmacological Examination Department of the National Center for Expertise of Medicines, Medical Devices and Medical Equipment of the Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan (Astana, Kazakhstan)

Yuriy S. Maklyakov, Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, Rostov State Medical University of the Ministry of Health of Russian Federation (Rostov-on-Don, Russia)

Gennadiy G. Matishov, Doctor of Geographical Sciences, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Academic Director of the Southern Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Chairman of the Presidium of the Southern Scientific Center of the Russian Academy of Sciences (Rostov-on-Don, Russia)

Anatoliy I. Miroshnikov, Doctor of Chemical Sciences, Academician of the Russian Academy of Sciences, Chairman of the Pushchino Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Deputy Director of the Shemyakin — Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences (Moscow, Russia)

Arkadiy N. Murashev, Doctor of Biological Sciences, Professor, Deputy Director, Head of the Laboratory of Biological Testing, Branch of the Shemyakin — Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences (Pushchino, Moscow region, Russia)

Sergey V. Okovitiy, Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, Saint-Petersburg State Chemical Pharmaceutical Academy of the Ministry of Health of the Russian Federation (Saint Petersburg, Russia)

Sergey Yu. Pchelintsev, Doctor of Medical Sciences, Professor, Director, Institute of Immunological Engineering (Lyubuchany, Chekhov District, Moscow Region, Russia)

Galina V. Ramenskaya, Doctor of Pharmaceutical Sciences, Professor, Head of the Department of Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, I. M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow, Russia)

Igor V. Reshetov, Doctor of Medical Sciences, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, the Head of the Department of oncology, radiotherapy and plastic surgery of the Institute of Professional Education, I. M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow, Russia)

Evgenia V. Shikh, Doctor of Medical Sciences, Professor, Director of the Institute of Vocational Education, Head of the Department of Clinical Pharmacology and Propaedeutics of Internal Diseases, I. M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow, Russia)

Evgeniy B. Shustov, Doctor of Medical Sciences, Professor, Academician of the Russian Academy of Natural Sciences, Professor of pharmacology and clinical pharmacology Department, Saint-Petersburg State Chemical Pharmaceutical Academy of the Ministry of Health of the Russian Federation, Chief Scientist, Institute of Toxicology of the Federal Medical and Biological Agency (Saint Petersburg, Russia)

Dmitriy A. Sychev, Doctor of Medical Sciences, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Vice rector for Development and Innovations, Head of Department of Clinical Pharmacology and Therapeutics, Russian Medical Academy of Postgraduate Education (Moscow, Russia)

Boris D. Tsygankov, Doctor of Medical Sciences, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Head of the Department of Psychiatry, Psychotherapy and Addiction, A. I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry (Moscow, Russia)

BIOMEDICINE

Valentina I. Tsys, Doctor of Agricultural Sciences, Professor, Academician of the Russian Academy of Natural Sciences, Professor of the Department of Animal Breeding, Smolensk State Agricultural Academy (Smolensk, Russia)

Vitan Vlahov, Doctor of Medical Sciences (Bulgaria), Professor, Academician of the Bulgarian Academy of Sciences and Arts, Consultant on Clinical Pharmacology and Therapeutics, Medical University (Sofia, Bulgaria)

Mikhail I. Voevoda, Doctor of Medical Sciences, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Director, Research Institute of Therapy and Preventive Medicine — Branch of the Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (Novosibirsk, Russia)

Andrey L. Zefirov, Doctor of Medical Sciences, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Honored Scientist of the Russian Federation and Republic of Tatarstan, Head of the Department of Normal Physiology, Kazan State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Kazan, Russia)

The group of preliminary expert examination of Editorial Council of Scientific Center for Biomedical Technology of the Federal Medical and Biological Agency (Svetlye Gory, Krasnogorsk District, Moscow Region, Russia)

Lyubov A. Bolotskikh (gnotobiology), Candidate of Agricultural Sciences, Head of the Laboratory of Gnotobiology

Dmitriy B. Chayvanov (alternative and mathematic modeling), Candidate of Physico-Mathematical Sciences, Head of the Inter-Institute Laboratory of Physical Methods in Biomedicine, Kurchatov Institute (Moscow, Russia), Scientific Center for Biomedical Technology of the Federal Medical and Biological Agency (Svetlye Gory, Krasnogorsk District, Moscow Region, Russia)

Yuriy V. Fokin (neuropharmacology, biomedicine ethology), Candidate of Biological Sciences, Head of the Laboratory of Neurotechnologies

Stanislav L. Lyublinskiy (biotechnology), Candidate of Biological Sciences, Head of the Laboratory of Applied Biotechnology and Biopharmaceutics

Elena L. Matveyenko (bioeconomy), Candidate of Economic Sciences, Associated Professor, Scientific Secretary

Artem O. Revyakin (biochemistry, pharmacotoxicology), Candidate of Biological Sciences, Head of the Laboratory of Pharmacomodeling

Khyzyr Kh. Semenov (laboratory animals-biomodels), Candidate of Biological Sciences, Head of the Laboratory of Biomodels

Olga I. Stepanova (cell technologies), Candidate of Biological Sciences, Head of the Laboratory of Cell Technologies

BIOMEDICINE

Founded:	The journal has been published since 2005.
Frequency:	Quarterly
DOI Prefix:	10.33647
ISSN	2074-5982 (Print) 2074-5982 (Online)
Mass media registration certificate:	Registered at the State Committee of the Russian Federation on Press under the number ПИ № ФС77-21324 от 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)
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 Biological Agency of Russia 143442, Russian Federation, Moscow region, Krasnogorsk, Settlement Svetlye Gory, building 1
Publisher:	Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical Biological Agency of Russia 143442, Russian Federation, Moscow region, Krasnogorsk, Settlement Svetlye Gory, building 1
Editorial office:	143442, Russian Federation, Moscow region, Krasnogorsk, Settlement Svetlye Gory, building 1 Tel.: +7 (495) 561-52-64 E-mail: scbmt@yandex.ru
Circulation:	3000 copies
Printing house:	BEAN, LLC. 603003, Russian Federation, Nizhny Novgorod region, Nizhny Novgorod, Barrikad str., 1

■ НОВЫЕ БИМЕДИЦИНСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ

Н.Н. Каркищенко, В.Н. Каркищенко, Ю.В. Фокин, С.Ю. Харитонов

Нейровизуализация эффектов психоактивных средств
 посредством нормализации электрограмм головного мозга 12

В.Н. Каркищенко, М.С. Дуля, Д.В. Хвостов, Р.А. Агельдинов, С.Л. Люблинский

Протеомный анализ в идентификации белковых компонентов
 препуциальной железы кабарги сибирской. 35

■ РЕЛЕВАНТНОЕ И АЛЬТЕРНАТИВНОЕ БИМОДЕЛИРОВАНИЕ

И.А. Помыткин, В.Н. Каркищенко

Роль и регуляция индуцируемого гипоксией фактора транскрипции-1
 и сукцинатного рецептора-1 при диабете типа 2: связь с сосудистыми осложнениями. . 48

Ю.И. Сысоев, С.Г. Дагаев, Л.Г. Кубарская, О.Н. Гайкова, Б.Ч. Узугбунам,

К. Модисе, Т.Л. Маквана, С.В. Оковитый

Нейропротекторная активность агониста альфа-2 адренорецепторов
 мафедина на модели черепно-мозговой травмы у крыс. 62

■ МЕТОДЫ БИМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Д.А. Сычев, Ш.П. Абдуллаев, К.Б. Мирзаев, К.А. Рыжикова, Г.Н. Шув,

Е.А. Гришина, Ж.А. Созаева, С.Н. Маммаев, Д.М. Гафуров, Е.Ю. Китаева, В.В. Шпрах,

С.Ш. Сулейманов, Л.З. Болиева, М.С.-Х. Созаева, С.М. Жучкова, Н.Е. Гималдинова,

Е.Е. Сидукова, А.В. Асоскова, Р.Б. Мумладзе

Генетические детерминанты безопасности применения прямого ингибитора
 тромбина среди этнических групп Российской Федерации. 78

Н.Л. Коломеец, О.В. Суслонова, С.Л. Смирнова, И.М. Рощевская

Биоэлектрический импеданс тела крыс при монокроталиновой модели
 легочной гипертензии 95

А.К. Мартусевич, А.А. Мартусевич, А.В. Дерюгина, С.П. Перетягин

Электрофоретическая оценка состояния мембран эритроцитов
 при действии активных форм кислорода и оксида азота 102

■ NEW BIOMEDICAL TECHNOLOGIES

- Nikolay N. Karkischenko, Vladislav N. Karkischenko, Yuriy V. Fokin, Sergey Yu. Kharitonov**
Neuroimaging of the Effects of Psychoactive Substances
by Means of Normalization of Brain Electrograms. 12

- Vladislav N. Karkischenko, Maxim S. Dulya, Daniil V. Khvostov, Ruslan A. Ageldinov, Stanislav L. Lyublinskiy**
Proteomic Analysis in the Identification of Active Components
in the Preputial Gland Secretion of the Siberian Musk Deer. 35

■ RELEVANT AND ALTERNATIVE BIOMODELING

- Igor A. Pomytkin, Vladislav N. Karkischenko**
The Role and Regulation of Hypoxia-Inducible Transcription Factor-1
and Succinate Receptor-1 in Type 2 Diabetes: a Link to Vascular Complications 48

- Yuriy I. Sysoev, Sergey G. Dagaev, Larisa G. Kubarskaja, Olga N. Gaikova, Brayt C. Uzuegbunam, Kagiso Modise, Terry L. Makwana, Sergey V. Okovitiy**
Study of the Neuroprotective Activity of Mafedine, an Alpha-2 Adrenergic
Receptor Agonist, by Modeling a Traumatic Brain Injury in Rats 62

■ BIOMEDICAL METHODS

- Dmitriy A. Sychev, Sherzod P. Abdullaev, Karin B. Mirzayev, Kristina A. Ryzhikova, Grigoriy N. Shuyev, Elena A. Grishina, Zhannet A. Sozaeva, Suleyman N. Mammaev, Daniyal M. Gafurov, Elena Yu. Kitaeva, Vladimir V. Shprakh, Salavat Sh. Suleymanov, Laura Z. Bolieva, Mariyam S.-Kh. Sozaeva, Svetlana M. Zhuchkova, Natalya E. Gimaldinova, Elena E. Sidukova, Anastasiya V. Asoskova, Robert B. Mumladze**
Genetic Determinants of the Safety of Dabigatran (CES1 Gene rs2244613
Polymorphism) for the Russian Population: A Multi-Ethnic Analysis 78

- Nataliia L. Kolomeyets, Olga V. Suslonova, Svetlana L. Smirnova, Irina M. Roshchevskaya**
Bioelectrical Impedance of the Body in Rats with Monocrotaline-Induced
Pulmonary Hypertension 95

- Andrey K. Martusevich, Anastasiia A. Martusevich, Anna V. Deriugina, Sergey P. Peretyagin**
Electrophoretic Study of Erythrocyte Membranes under the Action of Reactive
Oxygen Species and Nitric Oxide 102

НЕЙРОВИЗУАЛИЗАЦИЯ ЭФФЕКТОВ ПСИХОАКТИВНЫХ СРЕДСТВ ПОСРЕДСТВОМ НОРМАЛИЗАЦИИ ЭЛЕКТРОГРАММ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Н.Н. Каркищенко*, В.Н. Каркищенко, Ю.В. Фокин, С.Ю. Харитонов

ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская область
143442, Московская область, Красногорский район, п. Светлые горы, владение 1

Дефицит адекватных методов выявления психотропных свойств резко затормозил поиск новых психоактивных соединений. Слабо исследованы роль и место в формировании психических процессов β - и γ -ритмов электрограмм мозга. С другой стороны, трудно выделить даже главные компоненты психотропных средств на животных для экстраполяции в отношении человека. Этим вопросам и посвящена данная статья. Работа выполнена на кошках со стереотаксически имплантированными в разные отделы мозга электродами. Поскольку коммерческие электроэнцефалографы малоприменяемы для наших целей, в НЦБМТ ФМБА России были сконструированы специализированные устройства на микросхемах. Выбран оптимальный математический аппарат БПФ с оконным дискретным преобразованием Фурье на основе функций семейства Хэмминга.

Выполнялись нормализация и нормирование БПФ-преобразованных электрограмм мозга под влиянием доксиламина, ксилазина, кофеина, сертралина, фенотропила. Показана адекватность подхода к оценке фармакодинамики исследованных препаратов, имеющих, как правило, фазный характер, совпадающий с основными фармакокинетическими точками. β - и γ -диапазоны являются важнейшими показателями эффектов психотропных средств.

Ключевые слова: нейровизуализация, нормализация (нормирование), кошки, стереотаксически и хронически вживленные электроды, электрограммы головного мозга (ЭГМ), нормализованная ЭГМ (НЭМ), быстрое преобразование Фурье (БПФ), окно Хэмминга

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н., Фокин Ю.В., Харитонов С.Ю. Нейровизуализация эффектов психоактивных средств посредством нормализации электрограмм головного мозга. *Биомедицина*. 2019;15(1):12–34. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-1-12-34>

Поступила 07.02.2019

Принята после доработки 11.02.2019

Опубликована 10.03.2019

NEUROIMAGING OF THE EFFECTS OF PSYCHOACTIVE SUBSTANCES BY MEANS OF NORMALIZATION OF BRAIN ELECTROGRAMS

Nikolay N. Karkischenko*, Vladislav N. Karkischenko, Yuriy V. Fokin,
Sergey Yu. Kharitonov

Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical Biological Agency of Russia
143442, Russian Federation, Moscow region, Krasnogorsk, Settlement Svetlye Gory, building 1

The lack of adequate methods for identifying the psychotropic properties of various chemical compounds has dramatically hindered the search for new psychoactive substances. The role of β - and γ -rhythms of brain electrograms in the elucidation of mental processes is poorly investigated. On the other hand, even the isolation of the main acting components of psychotropic substances in animal studies for extrapolating to humans presents a challenge. This article is devoted to the aforementioned issues. This research was performed on cats with electrodes that had been stereotactically implanted in different parts of the brain. Since commercial electroencephalographs were not suitable for our purposes, specialized microchip devices were designed at the Scientific Centre for Biomedical Technologies (SCBMT), Russia. As a mathematical instrument, the fast Fourier transform (FFT) algorithm with a window discrete Fourier transform based on Hamming functions was implemented.

Normalization of the FFT-transformed brain electrograms recorded under the influence of doxylamine, xylazine, caffeine, sertraline, phenotropryl was carried out. The suitability of the proposed approach for assessing the pharmacodynamics of the studied substances, which are characterized by a phase character coinciding with the main pharmacokinetic points, is demonstrated. The β - and γ -rhythms are shown to be the most important indicators of the effects of psychotropic substances.

Keywords: neuroimaging, normalization, cats, stereotactically and chronically implanted electrodes, brain electrograms, normalized brain electrograms, fast Fourier transform, Hamming window

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

For citation: Karkischenko N.N., Karkischenko V.N., Fokin Yu.V., Kharitonov S.Yu. Neuroimaging of the Effects of Psychoactive Substances by Means of Normalization of Brain Electrograms. *Biomedicine*. 2019;15(1):12–34. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-1-12-34>

Submitted 07.02.2019

Revised 11.02.2019

Published 10.03.2019

Введение

Впервые Ричард Катон [12] обнаружил возникновение в мозге электрических потенциалов как при сенсорном раздражении, так и спонтанно, открыв и предложив термин «электроэнцефалография» (ЭЭГ). Ханс Бергер [11] дал толчок ЭЭГ, доказав, что ее частотные составляющие являются ритмами самого мозга. Бурное развитие ЭЭГ продвинулось от Бергера-ритма (α -ритм), но до последних лет ориентировалось на диапазон 0,5–35 Гц. Лишь в самые последние годы в поле зрения ученых попал гамма-ритм (γ -ритм), лежащий в диапазоне от 30 до 120–170 Гц. Он труден для анализа, т.к. его амплитуда ниже 10 мкВ и выявляется у человека лишь при работе мозга в критически сосредоточенном внимании. Некоторые авторы расширяют диапазон γ -ритма за 500 Гц.

Одним из ограничений глубокого анализа β - и γ -ритмов служила малая величина потенциалов и трудность их выделения из шумов. Требование времени, особенно

в военной физиологии, психофармакологии, спорте высших достижений, продиктовало необходимость расшифровки сути когнитивных процессов, восприятия, эмоциональных реакций, мобилизации энергетических, скоростных и волевых характеристик спортсмена, летчика, космонавта, оператора в боевых условиях и заставило обратиться к их анализу.

Одним из авторов данной статьи [5] в 70–80 гг. прошлого столетия было предложено решение этого вопроса путем нормирования ЭЭГ, преобразованной быстрым преобразованием Фурье (БПФ). Это существенно повысило точность измерения эффектов нейрпсихотропных средств. Метод получил название МППМ (модуль переходных процессов мозга), поскольку сами изменения ЭЭГ «обезличивались» и количественные проявления действия психотропных средств и реакция самого мозга выступали в относительных единицах в наиболее ярком и четком виде. Выявлялись более

интимные механизмы воздействия препаратов на мозг [3, 4, 5].

Развитие микроэлектроники, прикладной математики и психофармакологии дало нам ключ для принципиально новых исследований в этом направлении. Мы отказались от лапидарных методов регистрации ЭЭГ. Это потребовало пересмотра рутинных взглядов и формирования новой концепции нормализации экспериментальных электрограмм (ЭГ) по исходным, т.е. фоновым, характеристикам [7]. Для этого потребовалось создать усилители биопотенциалов на микросхемах, осуществлять оцифровку сигнала прямо с электрода.

Мы активно употребляем термин «электрограммы головного мозга» (ЭГМ) вместо ЭЭГ [7], поскольку последний принято понимать в чисто клиническом смысле как суммарный, хаотично замешанный поток импульсов, резко измененный при прохождении через структуры скальпа, электродных контактов и т.д. Из дальнейшего описания концепции будет ясно, что это не только новые методы, но и иные принципы и подходы к процессу.

Практически все, что известно сегодня о функциях и строении рецепторов, генерации и проведении сигналов в головном мозге, их информативности [1, 4], получено фармакохимическими методами [5]. Важная роль принадлежит клинической психофармакологии как критерию фундаментальных достижений.

Эффект фармакологического воздействия не только определяется «точкой приложения» на локальную констелляцию нейронов, но и через многие рецепторные и метаболические системы изменяет функции организма и, естественно, мозга в целом [3]. Процессы фармакодинамики и фармакокинетики лекарств тесно связаны, но не очевидны при экспериментальном и клиническом изучении. Количественный подход ЭГМ позволяет получить «соприкосновение» информа-

тивных точек фармакодинамики и фармакокинетики [7].

Другой стороной, интересующей нас, являются реакции ЭГМ в высокочастотной области β - и γ -ритмов (по ЭЭГ) при действии психотропных средств. Полагают, что γ -ритм — это пейсмейкерные посылки ретикулярной формации при максимальной активизации работы мозга. Интересно, что амплитуда γ -ритмов ниже 10 мкВ, обратно пропорциональна частоте [2, 8, 10]. Полагают, что γ -ритм связан с работой сознания и когнитивными функциями, а его амплитуда более 15 мкВ является патологической [3].

Недостаточная информативность результатов стандартной энцефалографии побуждает создавать новые подходы к детекции и анализу биоэлектрической активности мозга по параметрам ЭГ.

Фармакологическая коррекция интрацентральных отношений с помощью нейропсихоактивных средств и анализ получаемых данных посредством инновационных технологий детекции и распознавания может иметь большое значение для исследований сложных преобразований ЭГ мозга, прогнозирования психоактивных свойств биологически активных соединений и их комбинаций [5] и повышения информативности результатов доклинических исследований.

Целью работы явилась оценка влияния и нейровизуализация эффектов психоактивных средств разнонаправленного действия на интрацентральные отношения головного мозга крупных лабораторных животных (кошек) посредством анализа электрограмм, проводимого с помощью современного высокотехнологичного оборудования и программного обеспечения.

Материалы и методы

Объектами исследований явились взрослые кошки обоего пола в возрасте более 3 лет, не имеющие признаков чистопородности, массой тела 4–6 кг.

Кормление, содержание, карантин и обработка с животными подробно описаны в наших предыдущих работах по данной тематике [6, 7, 9].

Вживление электродов в головной мозг животных производилось стереотаксическим путем в виде разработанных электродных конструкций [6, 7].

Регистрация и анализ параметров электрограмм осуществлялись с помощью разработанных в НЦБМТ ФМБА России инновационных технических средств и программного обеспечения (микромодуль) [6, 7].

Выбор квазистационарных участков ЭГМ

Статистическая сложность электрограмм мозга, наличие в ней квазигармонических составляющих резко снижают эффективность их анализа. Это требует выбора достаточных для анализа стационарных участков, не менее 20–40 с.

Как известно из теоремы Котельникова (Шеннона — Найквиста), максимальная частота оцифровки сигнала должна быть как минимум в два раза выше максимальной частоты исследуемого амплитудного спектра. То есть любой аналоговый сигнал может быть восстановлен с какой угодно точностью по своим дискретным отсчетам, взятым с частотой $f > 2f_c$, где f_c — максимальная частота, которая ограничена спектром реального сигнала. Таким образом, повышая частоту дискретизации, возможно исследовать высокие диапазоны ЭГ мозга, получая информативные данные о структуре интрацентральных отношений головного мозга.

Об изменениях стационарности можно судить по показателям автокорреляционных функций, матожидания, а также по матожиданию (1) и дисперсии (2).

$$Im = \frac{Mi \max}{\sum_{i=1}^k Mi} \quad (1)$$

$$I_D = \frac{Di \max}{\sum_{i=1}^k Di}, \quad (2)$$

где I_m — коэффициент нестационарности по матожиданию, M_i — среднее значение процесса на i -м участке, D_i — значение дисперсии на i -м участке, I_D — коэффициент нестационарности дисперсии, k — число участков.

Выявление нестационарных участков по АКФ осуществлялось по формулам (3) и (4):

$$C_{ik} = \frac{1}{m} \sqrt{\sum_{\tau=0}^m [R_i(\tau) - R_k(\tau)]^2} \quad (3)$$

$$S_i = \frac{1}{n-1} \sum_{k=1}^n C_{ik}, \quad (4)$$

где $R_i(t)$ — значение АКФ i -го участка, $i=1, 2, 3 \dots n$.

Если S_i превышала значение, допустимое для обычной статистической выборочной изменчивости, то этот участок исключался. Для выяснения независимости выборочных оценок и выявления монотонных и колебательных трендов нами использованы критерии серии и тренда. Использование разностных фильтров приводило к снижению коэффициента нестационарности.

Исходя из комплексной программы электронного анализа ЭГ мозговых образований, нами определялись автокорреляционные функции (АКФ) и нормированные спектральные плотности процесса. Если ряд не удовлетворял условию стационарности, его пропускали через цифровой фильтр, устранявший нестационарную низкочастотную составляющую, и вновь подвергали проверке на стационарность.

Для дискретного стационарного временного ряда $X_1, X_2, X_3 \dots X_t$ выборочная оценка ковариационной функции определялась по формуле (5):

$$C_{xx}(rh) = \frac{1}{N} \sum_{t=1}^{N-r} (x_t - \bar{x})(x_{t+r} - \bar{x}), \quad (5)$$

где h — шаг квантования, определяемый из $n=1/2f_c$; f_c — наивысшая частота, присутствующая в анализируемой реализации; t — временной сдвиг АКФ.

Автокорреляционную функцию получа-

$$\text{ем из } \overline{R_{xx}}(\tau) = \frac{c_{xx}(\tau)}{c_{xx}(0)^0} \quad (6)$$

Исходя из формул (5) и (6), переходим к определению сглаженной выборочной оценки нормированной спектральной плотности:

$$\overline{G_{xx}}(f) = \overline{G_{xx}}\left(\frac{kf_c}{m}\right) = 2h \left[1 + 2 \sum_{\tau=1}^{m-1} D(\tau) \overline{R_{xx}}(r) \cos\left(\frac{\pi \tau k}{m}\right) \right], \quad (7)$$

где $k=0, 1, 2 \dots m$; $D(t)$ — весовая сглаживающая функция Тьюки, определяемая из следующего соотношения:

$$D(\tau) = \begin{cases} \frac{1}{2} & \left(1 + \cos \frac{\pi \tau}{m}\right); \text{ при } \tau = 0, 1, 2 \dots m \\ 0; & \text{при } \tau = m \end{cases} \quad (8)$$

Длина анализируемых реализаций составляла 10 с. Максимальный сдвиг АКФ составлял 2 с, т.е. $m=240$. Ширина окна спектральной плотности составляла 0,7 Гц.

Алгоритмы нормирования данных ЭГМ

В рамках данной работы нами было разработано программное обеспечение для математического анализа результатов нормирования (нормализации) ЭГМ при действии фармакологических факторов относительно фоновых значений ЭГМ.

В основе метода, обозначенного нами как **НЭМ**, для сравнительного анализа лежит методика оценки изменений в частотной области спектра снятых ЭГ до воздействия исследуемых факторов (фоновые данные) и после. Метод позволяет увидеть возбу-

ждение или депрессию активности исследуемых областей мозга в определенных ЭГ-ритмах.

Метод оценки спектра частотной области ЭГМ известен давно, но сравнительный анализ спектров с разницей по времени применяется впервые. Основой является преобразование отсчетов оцифрованного сигнала ЭГ $x(t)$ в амплитудный спектр $f(\omega)$ посредством преобразования Фурье (9).

$$f(\omega) = \int_{-\infty}^{+\infty} x(t) e^{-2\pi i \omega t} dt \quad (9)$$

В реальной практике применен вариант быстрого преобразования Фурье (БПФ) (10), поскольку он обеспечивает высокую скорость работы программного комплекса.

$$X_{TN}(k) = \sum_{n=0}^M x(nT) \omega \left(\frac{n}{M}\right) e^{-2\pi i \frac{kn}{N}}, \text{ где } k=0, 1 \dots N-1 \quad (10)$$

Имея определенное количество последовательных чисел, мы можем оперировать ими как одним множеством (V). Любые операции над множествами выполняются поэлементно. То есть, например, множество $\{6, 2\}$, сложенное с множеством $\{2, 3\}$, будет равно множеству $\{8, 5\}$.

Аналогово-цифровой преобразователь (АЦП) непрерывно, в течение одной секунды делает замеры с определенной частотой (в нашем случае — 128). После этого пакет входных данных отпра-

вляется с помощью микроконтроллера на компьютер.

Диапазон измерений напряжения на АЦП равен от -5 В до +5 В. Соответственно, одна единица данных представляет собой разницу напряжения на АЦП между определенной парой электродов.

После того как множество данных (длинной 128) получено на компьютер, оно обрабатывается при помощи БПФ. После преобразования получается множество комплексных чисел, длина которого рав-

на длине изначального множества. На этом этапе в множестве могут быть как положительные, так и отрицательные числа.

После этого от множества берется первая половина элементов, т.к. после БПФ множество симметрично относительно центра. Затем для каждого элемента множества вычисляется модуль комплексного числа. Теперь мы имеем множество длин векторов комплексных чисел. На этом этапе числа в множестве становятся больше или равны нулю, т.к. операция «модуль комплексного числа» возводит оба компонента в степень, равную двум. А любое рациональное чис-

ло, возведенное в степень, равную двум, будет положительным.

После набора необходимых данных (фоновые измерения + минимум одно измерение после воздействия) выполняется нормирование по формуле (11):

$$V_{\text{нормированное}} = \text{atan}\left(\frac{V_{\text{воздействия}}}{V_{\text{фона}}}\right). \quad (11)$$

Под воздействием понимается множество, измеренное при действии фармакологических, химических или физических факторов.

Для удобства вычислений нами использована функция atan2 (арктангенс двойного угла):

$$\text{atan2}(y, x) = \begin{cases} \arctan\left(\frac{y}{x}\right) & \text{if } x > 0 \\ \arctan\left(\frac{y}{x}\right) + \pi & \text{if } x < 0 \text{ and } y \geq 0 \\ \arctan\left(\frac{y}{x}\right) - \pi & \text{if } x < 0 \text{ and } y < 0 \\ +\frac{\pi}{2} & \text{if } x = 0 \text{ and } y > 0 \\ -\frac{\pi}{2} & \text{if } x = 0 \text{ and } y < 0 \\ \text{undefined} & \text{if } x = 0 \text{ and } y = 0 \end{cases} \quad (12)$$

Данная функция (12) позволяет обработать возможные нули.

После этой операции получается множество, все элементы которого лежат в диапазоне от 0 до $+\pi/2$.

Для борьбы с растеканием спектра применяют более гладкую оконную функцию спектра с более значимым главным лепестком к низким уровням боковых лепестков. Когда входной сигнал дискретизируется по времени, а не непрерывно, анализ обычно выполняется с применением оконной функции, а затем — дискретного преобразования Фурье (ДПФ).

Оконная функция — это математическая функция, которая имеет нулевое значение за пределами некоторого выбранного интервала, обычно симметричная относительно середины интервала. Основным назначением оконных функций является сужение, а не сегментация.

В типичных приложениях используемые оконные функции представляют собой неотрицательные гладкие колоколообразные кривые. Прямоугольник, треугольник и другие функции также могут быть использованы.

Для оптимизации и повышения точности преобразования Фурье мы просчитали наши данные с целью выбора окна (например, окно Кайзера, преобразования Парзена, Барлета, Чебышева, Уэлча, Гаусса и др. нижеприведенные), дающего наибольшее приближение экстремумов ритмов ЭГМ фона и воздействия. Рассмотрим пять следующих окон.

Прямоугольное окно (иногда называемое окном вагона или окном Дирихле) эквивалентно замене всех значений последовательности данных, кроме N, нулями. **Треугольное окно** является В-сплайновым окном 2-го порядка и может рассматриваться как свертка

двух прямоугольных окон шириной $N/2$. *Синусоидальное окно* — автокорреляция синусоидального окна создает функцию, известную как *окно Бохмана*, т.е. с линейно разделенным вектором. *Окна Ханна и Хэмминга* — функция, являющаяся членом семейства косинусоидов и степеней синуса. В отличие от окна Хэмминга, конечные точки окна Ханна просто касаются нуля. Приближение коэффициентов к двум десятичным разрядам существенно понижает уровень боковых лепестков до почти равноправного условия. *Окно Блэкмена — Харриса* — функция, вышедшая из семейства функций Хэмминга (рис. 1). Обобщение семейства функций Хэмминга, полученное

путем добавления более смещенных функций sinc, предназначено для минимизации уровней боковых лепестков. В настоящее время эта функция используется наиболее часто и позволяет получать информативные данные. Строго говоря, существуют еще десятки видов окон и их перекрытий, но окно Блэкмена — Харриса принято нами как оптимальное и перспективное. Именно окно Блэкмена — Харриса дает наибольшее приближение параметров отдельных ритмов в фоновых и экспериментальных ЭГМ, как бы концентрируя спектральные картины и повышая точность расчетов.

Для вычисления данной функции используется следующая формула:

$$w(n) = a_0 - a_1 * \cos\left(\frac{2*\pi*n}{N-1}\right) + a_2 * \cos\left(\frac{4*\pi*n}{N-1}\right) - a_3 * \cos\left(\frac{6*\pi*n}{N-1}\right), \quad (13)$$

где $w(n)$ — мультипликатор для элемента n ; n — индекс элемента; N — количество элементов (размер окна); a — коэффициенты: $a_0=0,35875$, $a_1=0,487396$, $a_2=0,144232$, $a_3=0,01168$.

Блок-схема устройства представлена на рис. 2.

Нейровизуализация параметров ЭГМ

Получаемые данные представлены на трех графиках, нанесенных на круговую векторную диаграмму и отражающих средние значения:

1) фоновых измерений — красные линии;

2) воздействия (экспериментальных данных) — синие линии;

3) НЭМ нормированных данных (десятичный логарифм) — желтые линии.

На диаграмме отмечены:

- цифровое кодирование по периметру — частоты ЭГ (1–64 Гц);
- спектральные характеристики ЭГ (круговые сектора) — от 0 (внутренний сектор) до $\lg 10^n$ (внешний сектор);

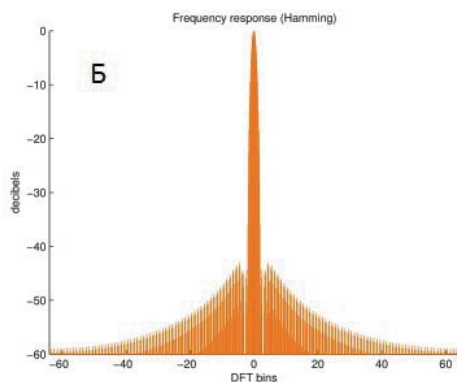
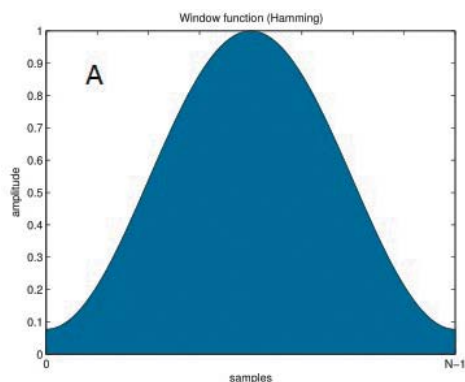


Рис. 1. Функция Хэмминга: А — окно Хэмминга, Б — нормированный спектр окна Хэмминга.

Fig. 1. Hamming function: A is the Hamming window; B is the normalized spectrum of the Hamming window.

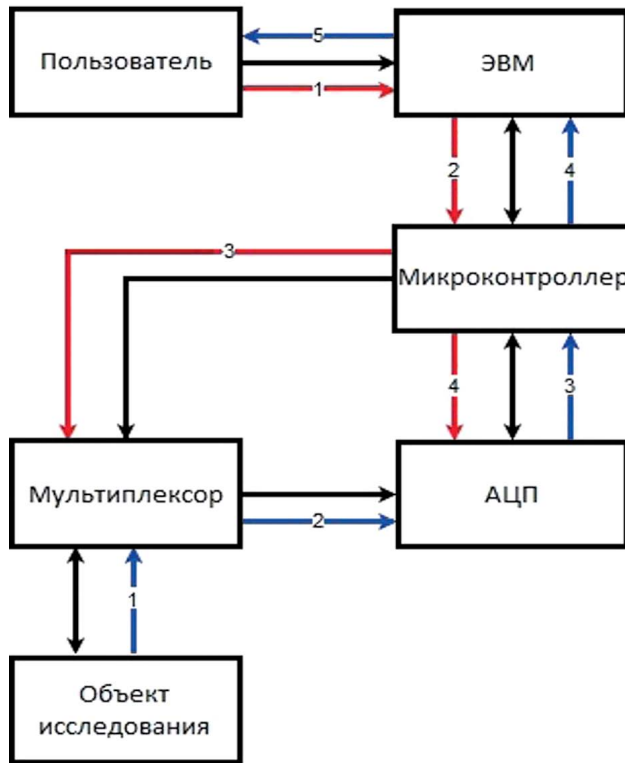


Рис. 2. Блок-схема устройства.

Первое действие (красные линии):

- 1) пользователь дает команду старта записи исследования и информацию об объекте исследования;
- 2) ЭВМ передает на микроконтроллер информацию об объекте исследования;
- 3) микроконтроллер настраивает мультимплексор с данными об объекте исследования;
- 4) микроконтроллер подготавливает АЦП к работе.

Второе действие (синие линии):

- 1) мультимплексор коммутирует сигнал от исследуемого объекта и передает его на АЦП;
- 2) АЦП, получая сигнал от мультимплексора, преобразует его в цифровую форму;
- 3) микроконтроллер забирает у АЦП результат преобразования;
- 4) микроконтроллер передает считанные данные из своей внутренней памяти в память ЭВМ на дальнейшую обработку;
- 5) после завершения записи ЭВМ оповещает об этом пользователя.

Fig. 2. A block diagram of the experimental device.

The first stage (red lines):

- 1) the user gives a command to start recording both the course of the study and information about the object under investigation;
- 2) the computer transmits the information about the object under investigation to a microcontroller;
- 3) the microcontroller adjusts the multiplexer to the information about the object under investigation;
- 4) the microcontroller prepares an ADC for operation.

The second stage (blue lines):

- 1) the multiplexer commutes the signal from the object under investigation and transmits it to the ADC;
- 2) having received the signal from the multiplexer, the ADC converts it into a digital form;
- 3) the microcontroller takes the conversion result from the ADC;
- 4) the microcontroller transfers the captured data from its internal memory to the computer memory for further processing;
- 5) upon the completion of the recording, the computer notifies the user thereof.

• базисная линия нормирования — с математической точки зрения, более корректно должна представлять собой нулевую линию, но для удобства восприятия и анализа принята за единицу. Расположение кривой НЭМ внутри (ближе к внутреннему сектору диаграммы) свидетельствует о снижении мощности частот ЭГ при воздействии по сравнению с фоновыми данными, расположение снаружи (ближе к внешнему сектору) — о повышении мощности частот ЭГ по сравнению с фоном.

На диаграммах указаны все частоты ЭГ анализируемого диапазона, и для удобства восприятия материала специалистами, привыкшими к традиционной форме интерпретации ЭГ, мы разграничили частоты согласно принятой классификации на дельта — δ (1–4 Гц), тета — θ (4–8 Гц), альфа — α (8–12 Гц), сигма — σ (12–16 Гц), бета — β (16–40 Гц) и гамма — γ (40–64 Гц) диапазоны, хотя результаты некоторых исследований показывают, что подобное деление не полностью соответствует современным представлениям.

Оценка нейropsychоактивных средств разнонаправленного действия

Доксиламин («Донормил», Франция) — блокатор гистаминовых H_1 -рецепторов из группы этаноламинов, оказывающий снотворное, седативное и м-холиноблокирующее действие, сокращающий время засыпания.

Ксилазин («Ксила», Нидерланды) — агонист центральных α_2 -адренорецепторов, оказывающий седативное, анальгезирующее и миорелаксирующее действие. Используется в ветеринарной практике как препарат для наркотизирования.

Кофеин («Кофеин-бензоат натрия», Россия) — психостимулирующее средство, усиливающее и регулирующие процессы возбуждения.

Сертралин («Стимулотон», Венгрия) — антидепрессант, селективный ингибитор обратного захвата серотонина (СИОЗС), а также норадреналина и допамина. Не

оказывает стимулирующего, седативного или антихолинергического действия. Не обладает сродством к м-холино-, серотониновым, допаминовым, гистаминовым, адрено-, ГАМК- и бензодиазепиновым рецепторам.

Фенотропил («Фенотропил», Россия) — ноотроп, имеющий также ярко выраженное анксиолитическое и нейромодулирующее действия. Улучшает память, настроение и процесс обучения.

Данные препараты являются отдельными представителями разных фармакологических групп, что и определило критерии выбора тестируемых средств. Поскольку изменения ритмических характеристик связаны в т.ч. со временем влияния на активность мозга и ВНД, мы сочли необходимым сопоставить временные изменения с фармакокинетическими параметрами тестируемых средств. В процессе анализа учитывались и их фармакодинамические показатели.

Все указанные препараты применялись в эквивалентных человеку терапевтических дозах, режим регистрации параметров ЭГ мозга определялся согласно имеющимся фармакокинетическим и фармакодинамическим данным, на графиках представлены наиболее характерные результаты по обозначенным реперным точкам.

Результаты исследований

Посредством регистрации и анализа ЭГ определены информативные параметры, свидетельствующие об изменении биоэлектрической активности мозга при действии тестируемых нейropsychоактивных средств.

Результаты влияния доксиламина на параметры ЭГМ и НЭМ представлены на рис. 3–8.

Через 30 мин после введения тестируемого препарата на ЭГ наблюдается преобладание мощности частот около 34 и 54–55 Гц, которые по ранее принятой классификации относятся к β - и γ -диапазонам. На данном этапе исследования препарат характеризу-

ется активирующим действием в заднем ядре гипоталамуса, наиболее выражено (здесь и далее — более чем на 50%) оно проявляется на частотах 7–11, 14–15, 36–37, 39–43 Гц (около 80%), 53–55, 61–64 Гц (около 60%). Также прослеживаются элементы угнетения в области 5–7, 11–14, 34–36 Гц. По всей видимости, на данном этапе анализа уже начинают прослеживаться тормозные эффекты препарата, вызванные активацией данной области мозга.

Через 2 ч после введения на ЭГМ наблюдаются пики сходной мощности практически на всем анализируемом диапазоне, с преобладанием в области около 37 Гц,

относящейся традиционно к β -диапазону. Общая картина НЭМ на данном этапе исследования по-прежнему характеризуется активирующим действием в исследуемой области мозга, наиболее выражено оно проявляется на частотах 14–15, 36–37 Гц (80–120%). Также прослеживаются элементы угнетения в области 11–14, 15–16, 35–36 Гц (σ - и β -диапазон). На основании чего можно судить о продолжающемся тормозном действии тестируемого средства.

Через 4 ч после введения наблюдается аналогичная скачкообразная картина ЭГ с пиками сходной мощности практически на всем анализируемом диапазоне, однако кривая НЭМ существенно приблизилась к фоновой. В целом можно судить о небольших отличиях от фоновых данных — преимущественно в области около 9 и 29–30 Гц, по ранее принятой классификации относящихся к α - и β -диапазонам.

Однако через 6 ч после введения снова наблюдается активация данного участка мозга в виде повышения мощности частот по сравнению с фоном, наиболее отчетливо прослеживающегося на частотах около 14–15, 23–27, 36–37, 53–54 Гц.

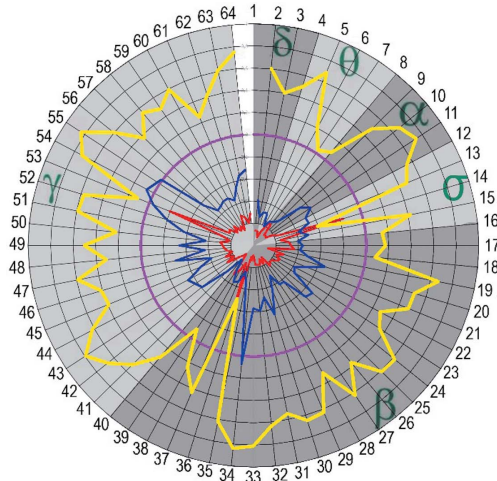


Рис. 3. Параметры ЭГМ и НЭМ через 30 мин после введения доксиламина.

Отдел мозга: NHP — nucleus hypothalamic posterior — заднее ядро гипоталамуса.

Красная кривая — фоновые измерения, синяя кривая — воздействие, желтая кривая — НЭМ. Розовый контур — базисная линия нормирования. Цифровое кодирование по периметру — частоты, Гц. Круговые сектора — спектральные характеристики ЭГМ.

Fig. 3. Parameters of brain electrograms (BE) and normalized brain electrograms (NBE) 30 min after the administration of doxylamine.

Brain division: NHP — nucleus hypothalamic posterior — the posterior nucleus of the hypothalamus.

The red curve is background measurements, the blue curve is impact, the yellow curve is NBE. The pink contour is the basic line of valuation. Digital coding on the perimeter is the frequency, Hz. Circular sectors are the spectral characteristics of BE.

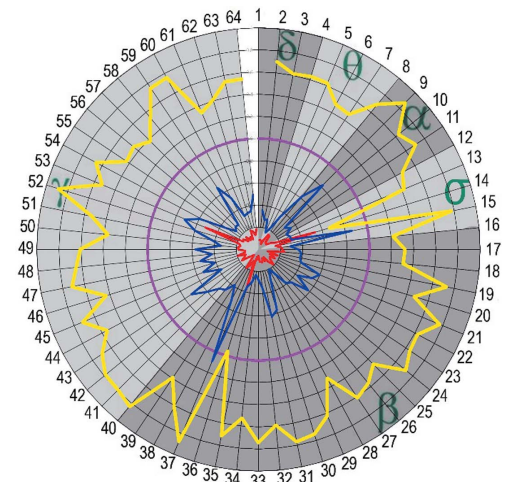


Рис. 4. Параметры ЭГМ и НЭМ через 2 ч после введения доксиламина. Все обозначения — как на рис. 3.

Fig. 4. BE and NBE parameters 2 h after the administration of doxylamine. For all designations, see Fig. 3

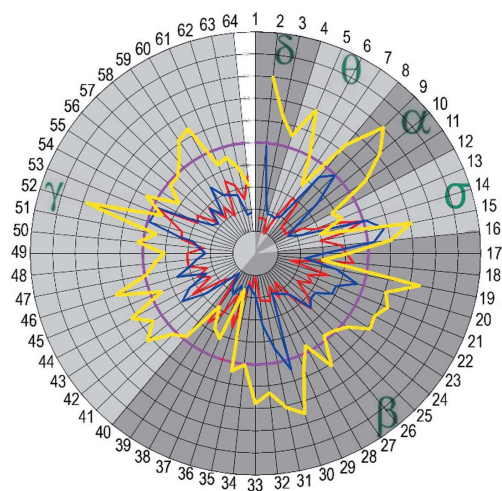


Рис. 5. Параметры ЭГМ и НЭМ через 4 ч после введения доксиламина. Все обозначения — как на рис. 3.
Fig. 5. BE and NBE parameters 4 h after the administration of doxylamine. For all designations, refer to Fig. 3.

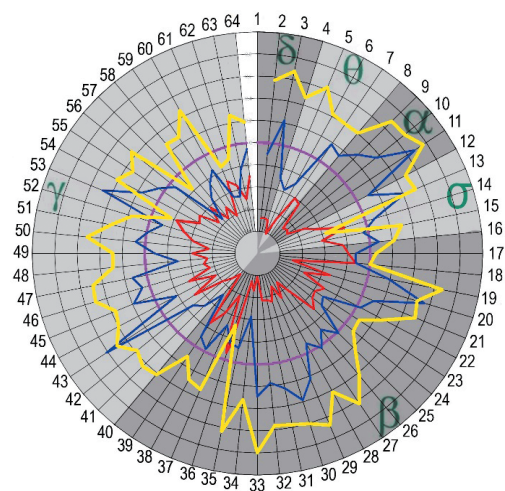


Рис. 6. Параметры ЭГМ и НЭМ через 6 ч после введения доксиламина. Все обозначения — как на рис. 3.
Fig. 6. BE and NBE parameters 6 h after the administration of doxylamine. For all designations, refer to Fig. 3.

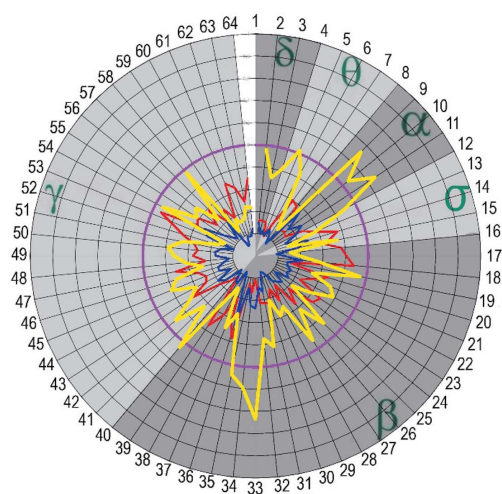


Рис. 7. Параметры ЭГМ и НЭМ через 8 ч после введения доксиламина. Все обозначения — как на рис. 3.
Fig. 7. BE and NBE parameters after 8 h after the administration of doxylamine. For all designations, refer to Fig. 3.

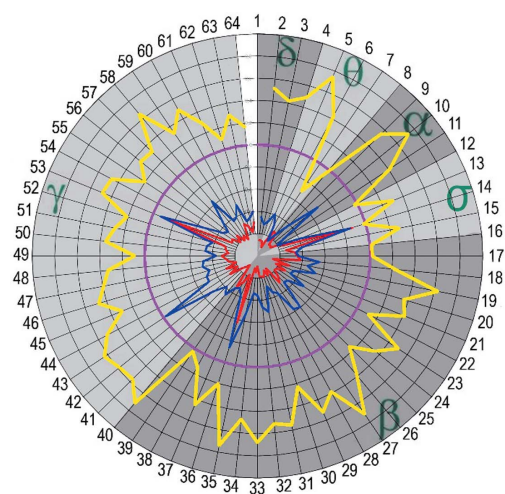


Рис. 8. Параметры ЭГМ и НЭМ через 24 ч после введения доксиламина. Все обозначения — как на рис. 3.
Fig. 8. BE and NBE parameters 24 h after the administration of doxylamine. For all designations, refer to Fig. 3.

Существенно картина ЭГМ меняется через 8 ч после введения. На данном этапе наблюдается угнетение гипоталамуса, наиболее выраженное на 5–8 Гц (около 80%), 11–14 Гц (около 100%), 33–37 Гц (около 120%) и 58–59 Гц (около 80%). Наблюдаются небольшие эпизоды активации (8–11 Гц,

около 100%). Данные эффекты, вероятно, связаны с окончанием успокаивающего действия доксиламина.

Через 24 ч после введения параметры НЭМ вновь отражают активацию исследуемой зоны мозга. Наибольшие изменения прослеживаются в области 7–10

и 17–19, 39–40 Гц (т.е. α - и β -диапазонах, согласно традиционной интерпретации), отражающие эффекты их нормализации, выравнивания.

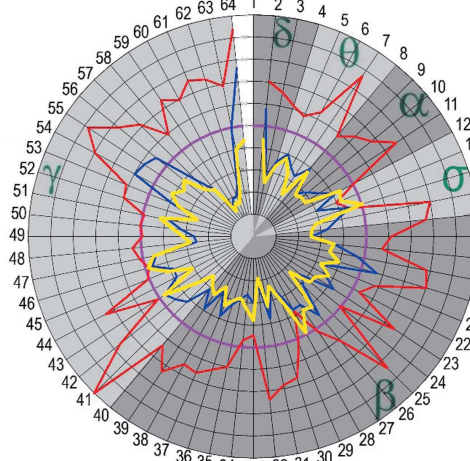


Рис. 9. Параметры ЭГМ и НЭМ через 20 мин после введения ксилазина.

Отдел мозга: Pr — Gyrus prorealis — прореальная извилина.

Все обозначения — как на рис. 3.

Fig. 9. BE and NBE parameters 20 min after the administration of xylazine.

Brain department: Pr — Gyrus prorealis — preoreal gyrus. For all designations, refer to Fig. 3.

Многофазное действие доксиламина заключается в преимущественной активации заднего ядра гипоталамуса, с угнетением через 8 ч после введения и восстановлением активности на следующие сутки. Согласно данным фармакокинетики, действие препарата продолжается около 6–8 ч, т.е. признаки угнетения связаны с процессом

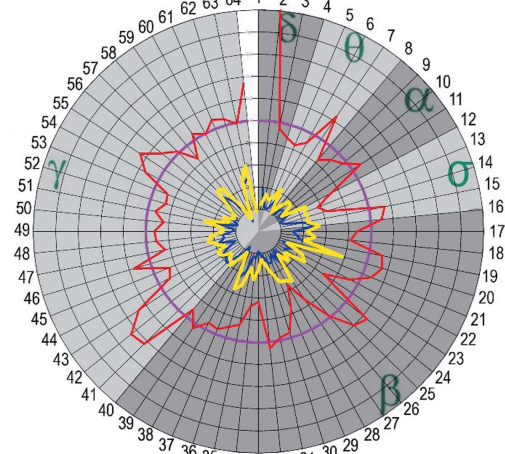


Рис. 10. Параметры ЭГМ и НЭМ через 45 мин после введения ксилазина. Все обозначения — как на рис. 3.

Fig. 10. BE and NBE parameters 45 min after the administration of xylazine. For all designations, refer to Fig. 3.

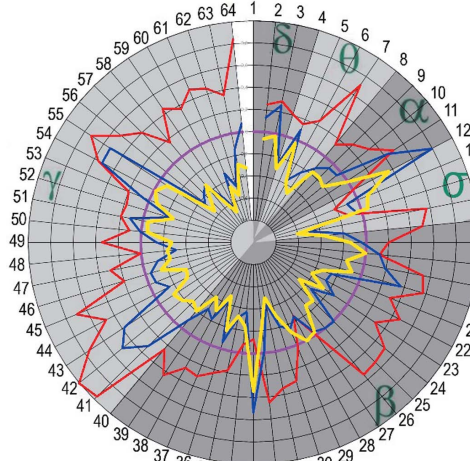


Рис. 11. Параметры ЭГМ и НЭМ через 1 ч после введения ксилазина. Все обозначения — как на рис. 3.

Fig. 11. BE and NBE parameters 1 h after the administration of xylazine. For all designations, refer to Fig. 3.

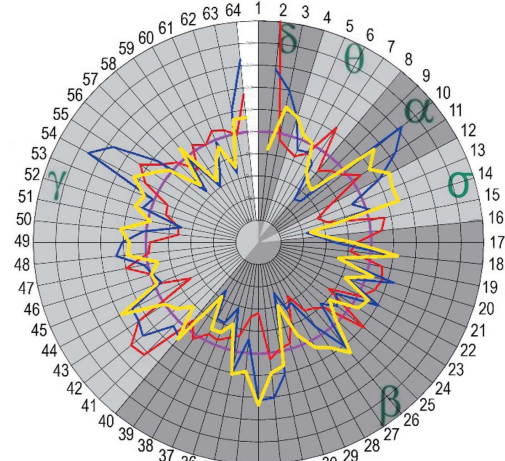


Рис. 12. Параметры ЭГМ и НЭМ через 24 ч после введения ксилазина. Все обозначения — как на рис. 3.

Fig. 12. BE and NBE parameters 24 h after the administration of xylazine. For all designations, refer to Fig. 3.

элиминации, а наблюдаемые через 24 ч результаты отражают остаточные эффекты препарата, имеющего достаточно длительный период полувыведения (около 10 ч).

Результаты влияния ксилазина на параметры ЭГМ и НЭМ представлены на рис. 9–12.

Депримирующее действие препарата прослеживается уже через 20 мин после введения: НЭМ отражает угнетение исследуемой области мозга, наибольшая мощность наблюдается на частотах около 54–56 и 64 Гц (β - и γ -диапазоны по традиционной классификации).

Через 45 мин после введения данные эффекты угнетения усиливаются. Спектральные характеристики ЭГМ на всем анализируемом частотном диапазоне минимальны (снижение на 60–80% по сравнению с фоном).

Однако уже через 1 ч после введения картина ЭГМ начинает восстанавливаться. Наибольшая мощность приходится на частоты около 8–12 и 32–33 Гц. Наблюдаемые эффекты отражают, по всей види-

мости, окончание действия тестируемого средства.

Через 24 ч общая картина ЭГМ практически не отличима от фоновых замеров. Преобладающие всплески регистрируются на 10 и 54 Гц, т.е. в α - и γ -диапазонах, согласно принятому делению. Наблюдаемые эффекты позволяют заключить, что существенного влияния препарата на активность мозга на данном этапе исследования не имеется.

Таким образом, депримирующее, угнетающее действие ксилазина проявляется практически сразу после введения, что согласуется с фармакокинетическими параметрами (S_{max} = 20–30 мин). Эффект быстрый и короткий, в связи с чем препарат используется в качестве наркоза при проведении хирургических вмешательств и других процедур, связанных с седацией, анальгезией и миорелаксацией.

Результаты влияния кофеина на параметры ЭГМ и НЭМ представлены на рис. 13–18.

Активирующее действие препарата, проявляющееся в возбуждении переднего отдела гиппокампа, прослеживается уже через 10 мин после введения: наибольшая мощ-

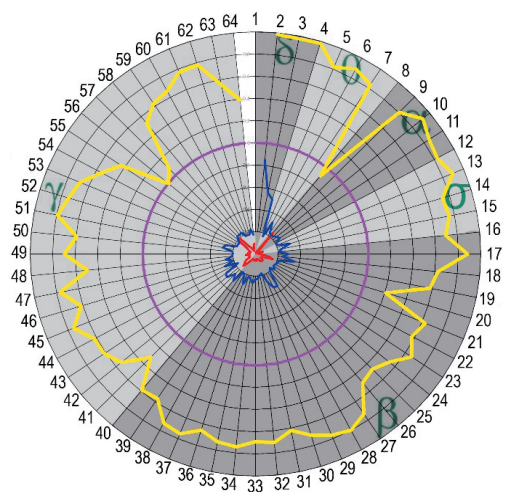


Рис. 13. Параметры ЭГМ и НЭМ через 10 мин после введения кофеина.

Отдел мозга: HIPa — Hippocampus anterior — передний отдел гиппокампа.

Все обозначения — как на рис. 3.

Fig. 13. BE and NBE parameters 10 min after the administration of caffeine. Brain division: HIPa — Hippocampus anterior — anterior hippocampus.

For all designations, refer to Fig. 3.

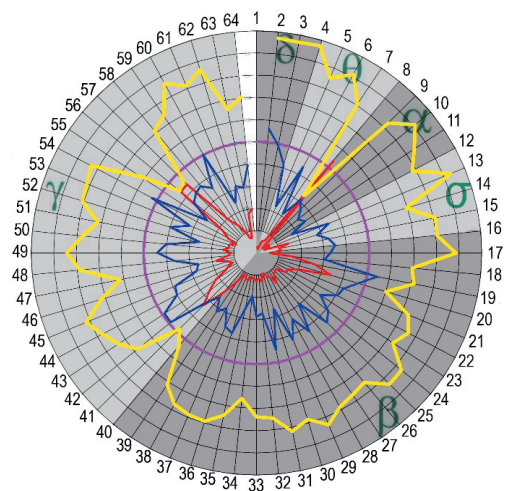


Рис. 14. Параметры ЭГМ и НЭМ через 20 мин после введения кофеина. Все обозначения — как на рис. 3.

Fig. 14. BE and NBE parameters 20 min after the administration of caffeine. For all designations, refer to Fig. 3.

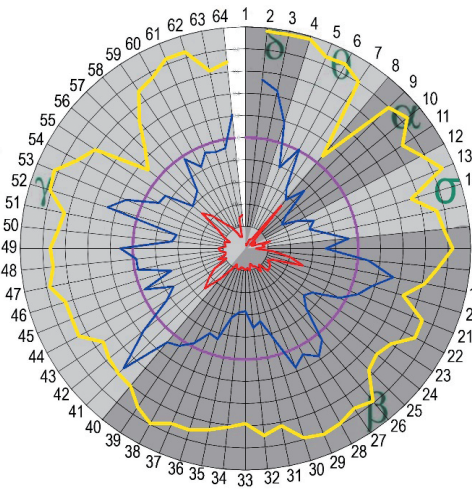


Рис. 15. Параметры ЭГМ и НЭМ через 1 ч после введения кофеина. Все обозначения — как на рис. 3.
Fig. 15. BE and NBE parameters 1 h after the administration of caffeine. For all designations, refer to Fig. 3.

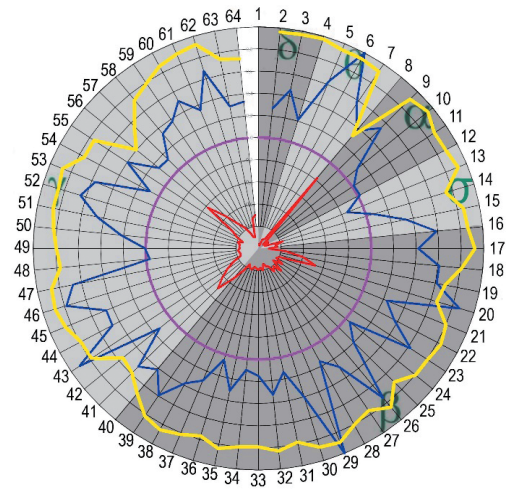


Рис. 16. Параметры ЭГМ и НЭМ через 4 ч после введения кофеина. Все обозначения — как на рис. 3.
Fig. 16. BE and NBE parameters 4 h after the administration of caffeine. For all designations, refer to Fig. 3.

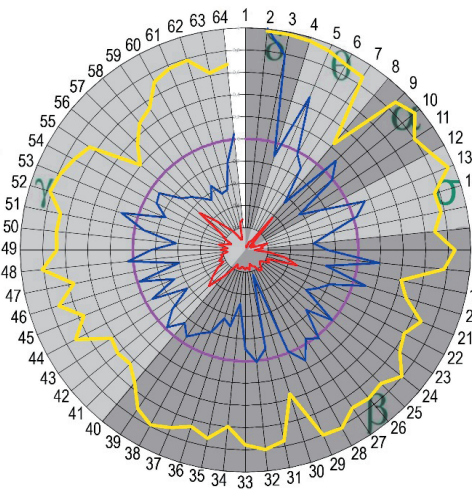


Рис. 17. Параметры ЭГМ и НЭМ через 6 ч после введения кофеина. Все обозначения — как на рис. 3.
Fig. 17. BE and NBE parameters 6 h after the administration of caffeine. For all designations, refer to Fig. 3.

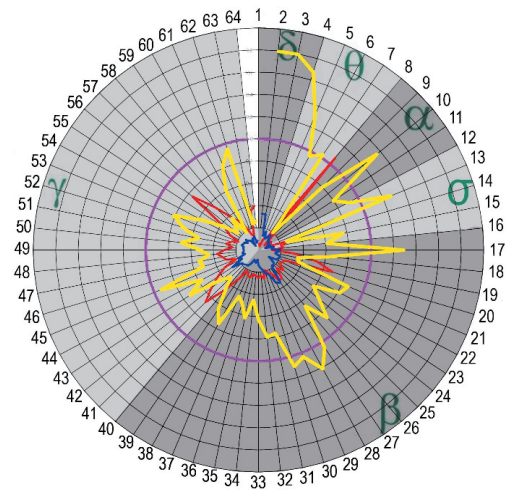


Рис. 18. Параметры ЭГМ и НЭМ через 24 ч после введения кофеина. Все обозначения — как на рис. 3.
Fig. 18. BE and NBE parameters 24 h after the administration of caffeine. For all designations, refer to Fig. 3.

ность ЭГМ наблюдается на частоте 2 Гц. На кривой НЭМ особенно выражены возрастания мощности на частотах около 8–9 и 58–61 Гц (около 80% разницы по сравнению с фоном).

Через 20 мин после введения общая картина сохраняется, однако исходная кривая

имеет более скачкообразный вид. Указанные выше преобразования спектральных характеристик прослеживаются еще более отчетливо (120% от фона).

Через 1 ч после введения также наблюдается активация исследуемой зоны мозга, однако на исходном графике преобладающая

мощность смещается в область 2–3, 17–19, 33–41 и 51–52 Гц, т.е. δ -, β - и γ -диапазонов, согласно ранее принятой классификации.

Через 4 ч после введения препарата преобладающие диапазоны вновь сглаживаются, но эффекты активации сохраняются.

Те же результаты характерны и для периода 6 ч после введения, при этом вновь можно заметить преобладание на исходной кривой частоты 2–3 Гц (δ -диапазона, по принятому делению).

Через 24 ч после введения отмечается угнетение исследуемой зоны мозга в высоких частотных диапазонах (30 Гц и выше), а в диапазоне от 1 до 30 Гц мощность ЭГ практически сходна с таковой в фоновых измерениях.

Длительное возбуждение переднего отдела гиппокампа, характеризующее активирующее действие кофеина, проявляется практически сразу после введения и сохраняется на протяжении минимум 6 ч, что обуславли-

вает его применение в качестве эффективно-го психостимулирующего средства.

Результаты влияния сертралина на параметры ЭГМ и НЭМ представлены на рис. 19–24.

Через 30 мин после введения тестируемого средства наблюдаются депримирующие (угнетающие) эффекты в области поясной извилины, основная мощность регистрируется на частотах 7 и 17–19 Гц, т.е. в θ - и β -диапазонах, согласно ранее принятой классификации. На кривой НЭМ некоторые дополнительные пики обнаруживаются в области 10–13 Гц (условно α - и σ -диапазоны).

Через 1 ч после введения исходная кривая имеет скачкообразный вид, спектральные характеристики распределяются по всему анализируемому частотному диапазону, при этом угнетение данной зоны мозга сменяется на активацию.

Через 2 ч после введения вновь наблюдается картина, характерная для 30 мин. Преобладающая мощность обнаруживается на частотах около 18 и 40 Гц (β -диапазон, согласно принятому делению). Кривая НЭМ по-прежнему рваная (множество пиков сходной мощности), превалируют эффекты угнетения.

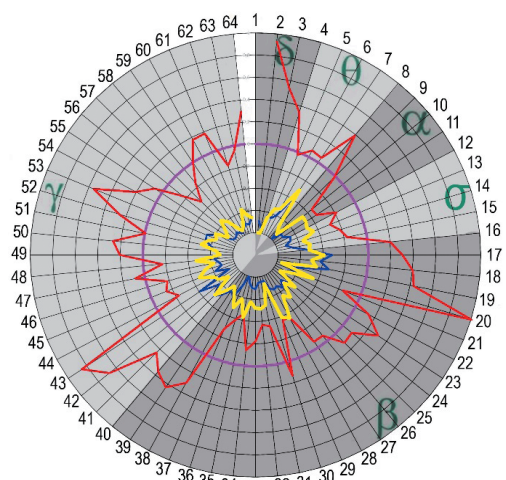


Рис. 19. Параметры ЭГМ и НЭМ через 30 мин после введения сертралина.

Отдел мозга: GC — Gyrus cingule — поясная извилина. Все обозначения — как на рис. 3.

Fig. 19. BE and NBE parameters 30 min after administration of sertraline.

Brain Department: GC — Gyrus cingule — cingulate gyrus.

For all designations, refer to Fig. 3.

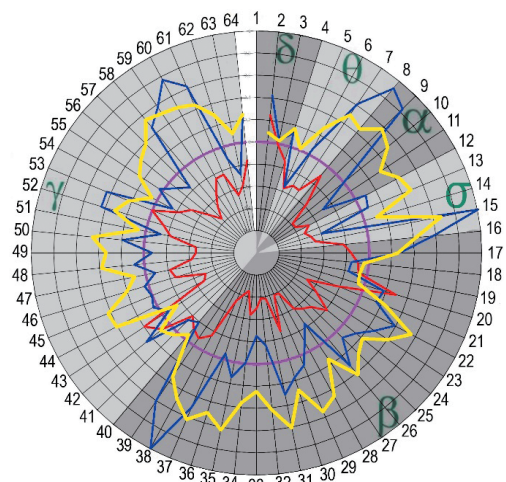


Рис. 20. Параметры ЭГМ и НЭМ через 1 ч после введения сертралина. Все обозначения — как на рис. 3.

Fig. 20. BE and NBE parameters 1 h after the administration of sertraline. For all designations, refer to Fig. 3.

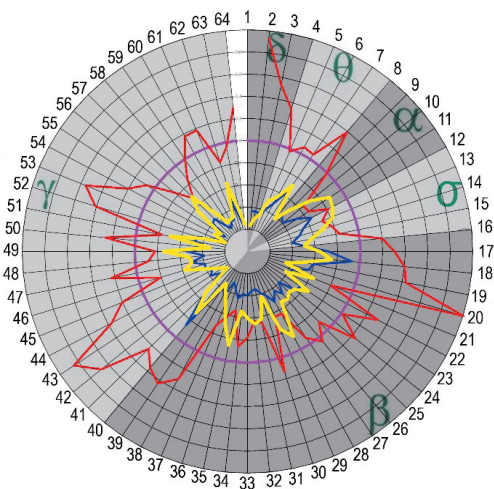


Рис. 21. Параметры ЭГМ и НЭМ через 2 ч после введения сертралина. Все обозначения — как на рис. 3.
Fig. 21. BE and NBE parameters 2 h after the administration of sertraline. For all designations, refer to Fig. 3.

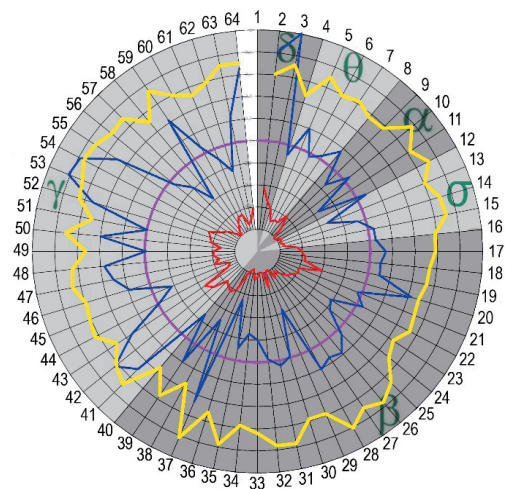


Рис. 22. Параметры ЭГМ и НЭМ через 4 ч после введения сертралина. Все обозначения — как на рис. 3.
Fig. 22. BE and NBE parameters 4 h after the administration of sertraline. For all designations, refer to Fig. 3.

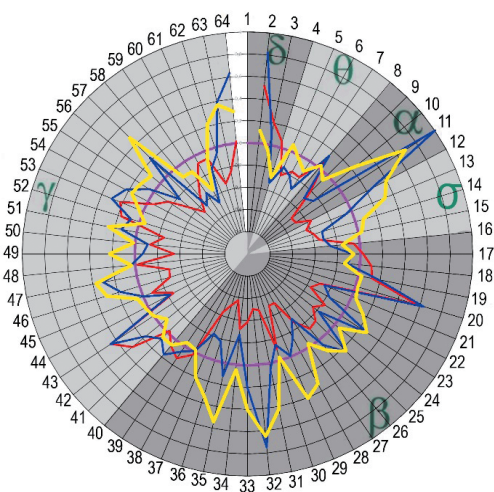


Рис. 23. Параметры ЭГМ и НЭМ через 6 ч после введения сертралина. Все обозначения — как на рис. 3.
Fig. 23. BE and NBE parameters 6 h after the administration of sertraline. For all designations, refer to Fig. 3.

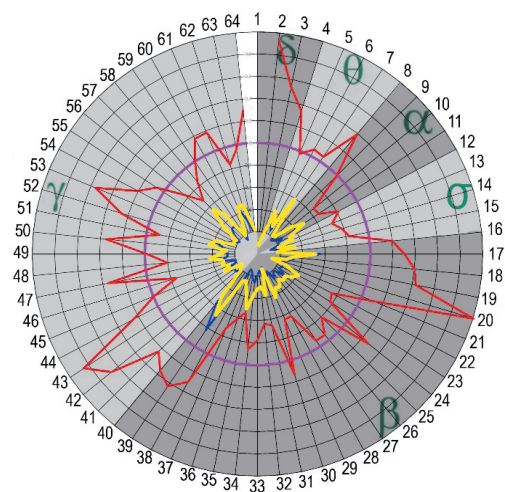


Рис. 24. Параметры ЭГМ и НЭМ через 24 ч после введения сертралина. Все обозначения — как на рис. 3.
Fig. 24. BE and NBE parameters 24 h after the administration of sertraline. For all designations, refer to Fig. 3.

Через 4 ч после введения вновь наблюдается возбуждение, пики мощности на исходной кривой смещаются в область 41–42, 54–55, 64 Гц (условно γ -диапазона). Кривая НЭМ без видимых экстремумов.

Через 6 ч после введения картина НЭМ близка к фоновой, наибольшая мощ-

ность — в области 11, 32, 35, 57 Гц (α - и β -диапазоны, согласно традиционной классификации).

Через 24 ч после введения биоэлектрическая активность в исследуемой зоне практически затухает, обнаруживаются единичные пики на частоте около 39 Гц.

Наблюдаемые депримирующие эффекты сходны с таковыми на 30 мин анализа.

Разнонаправленное действие сертралина на поясную извилину, по-видимому, отра-

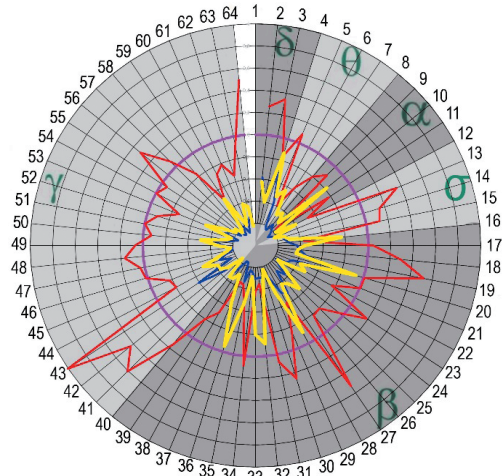


Рис. 25. Параметры ЭГМ и НЭМ через 1 ч после введения фенотропила.

Отдел мозга: Pr — Gyrus prorealis — прореальная извилина.

Все обозначения — как на рис. 3.

Fig. 25. BE and NBE parameters 1 h after the administration of phenotropyl.

Brain department: Pr — Gyrus prorealis — preoreal gyrus. For all designations, refer to Fig. 3.

жает особенности его антидепрессивного действия, а схожесть результатов анализа сразу после введения и на следующие сутки может свидетельствовать о накопительных эффектах тестируемого препарата.

Результаты влияния фенотропила на параметры ЭГМ и НЭМ представлены на рис. 25–28.

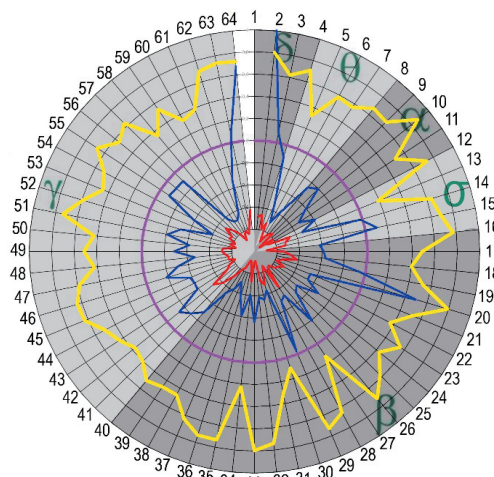


Рис. 26. Параметры ЭГМ и НЭМ через 2 ч после введения фенотропила. Все обозначения — как на рис. 3.

Fig. 26. BE and NBE parameters 2 h after the administration of phenotropyl. For all designations, refer to Fig. 3.

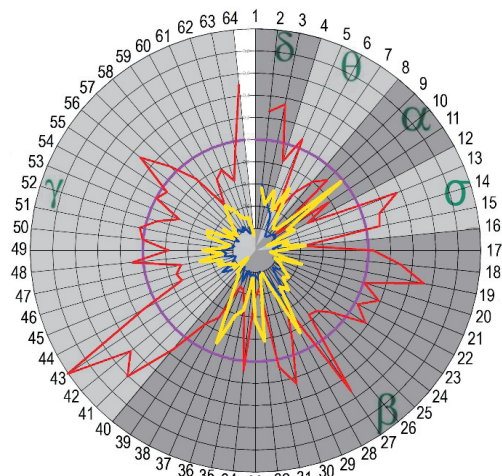


Рис. 27. Параметры ЭГМ и НЭМ через 4 ч после введения фенотропила. Все обозначения — как на рис. 3.

Fig. 27. BE and NBE parameters 4 h after the administration of phenotropyl. For all designations, refer to Fig. 3.

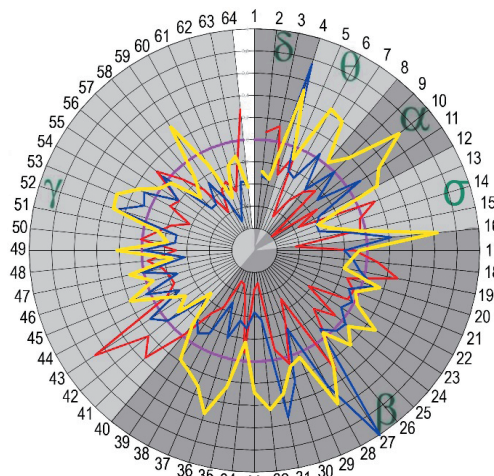


Рис. 28. Параметры ЭГМ и НЭМ через 24 ч после введения фенотропила. Все обозначения — как на рис. 3.

Fig. 28. BE and NBE parameters 24 h after the administration of phenotropyl. For all designations, refer to Fig. 3.

Через 1 ч после введения тестируемого средства наблюдается его депримирующее действие на прореальную извилину: НЭМ отражает угнетение исследуемой области мозга и имеет скачкообразный вид, наибольшая мощность обнаруживается в первой половине частотного диапазона (1–36 Гц).

Через 2 ч после введения на исходной ЭГМ преобладающая мощность регистрируется в широком диапазоне частот: около 2, 14–15, 19–20, 53–57, 60–64 Гц. Общая картина на данном этапе исследования характеризуется активирующим действием в исследуемой области мозга, без явных экстремумов на кривой НЭМ.

Через 4 ч после введения вновь наблюдается обратный эффект: угнетение, наибольшая мощность обнаруживается в первой половине частотного диапазона (до 37 Гц).

Через 24 ч после введения на исходной кривой преобладающие спектральные характеристики обнаруживаются на частотах около 4, 27 и 31 Гц, картина НЭМ в целом близка к фоновым значениям.

Таким образом, разнонаправленное влияние фенотропила на прореальную извилину, по-видимому, отражает особенности его ноотропного действия, а отсутствие существенного влияния на мозг через 24 ч свидетельствует о выведении препарата ($T_{1/2}=3-5$ ч) на этом временном промежутке.

Заключение

Последние десятилетия стало тенденцией говорить о системном кризисе психофармакологии [21]. Так, с начала века количество исследовательских программ по поиску новых психотропных средств сократилось на 75–80%. Ряд фирм (Pfizer, Bayer, Novartis, Roche и др.) практически остановили разработку новых психотропов. Стагнация определяется отсутствием как новых предложений со стороны психиатрии, так и прорывных технологий в экспериментальной фармакологии [32]. Клиническая

фармакология практически выпала из этого процесса, утонув в фармакоэкономике и фармакоэпидемиологии, работая по заказам транснациональных фармацевтических гигантов. Кроме того, поиск новых инновационных средств не может строиться на рутинных, «дедовских» методиках [27].

Созданные в самом начале 1950-х гг. антипсихотические средства (хлорпромазин), антидепрессанты (имипрамин), бензодиазепины до сих пор не рассматриваются как антидофаминовые, нейротрансмиттерные и ГАМК-эргические средства соответственно [37]. Новые средства, такие как СИОЗС, атипичные нейролептики и т.д., уступают «старым» по эффективности [19]. Важным сдерживающим фактором прогресса психофармакологии является отсутствие адекватных методических приемов, включая транскраниальную стимуляцию [22]. Ограничение с использованием животных в эксперименте стало всемирным, а чуть ли не единственным объектом исследования стала лабораторная крыса [13, 16].

Один пример. Брошенная в холодную воду крыса барахтается, а когда замирает, то это оценивают как «депрессию», потому что имипрамин удлинит ее барахтанье. Другой тест: взбегание крысы по скользящей веревке «до отказа». Это также тест и на «депрессию», и на «тревожность» [3]. Но какая связь этих явлений с нозологическими и социальными процессами у человека? А ведь эти данные с крыс без всяких поправок переносятся на человека [12, 29, 36]. Но ведь сколько бы крыса ни взбегала по веревочке, ей никогда не придет мысль набросить ее себе на шею. Другой пример: измерение времени, которое крыса проводит на освещенном, открытом пространстве, не прячась, принято за тест для оценки уровня тревожности [3]. Используются самцы крыс, тогда как тревожность у женщин встречается в 10 раз чаще, чем у мужчин [5, 15, 35].

Зацикленность на молекулярных механизмах поведения крыс, эволюционная дистанция между их мозгом и мозгом человека колоссально разграничивает человеческую тревожность, депрессию [34], психоз и паркинсонизм [30, 31] от полученных на крысиных моделях. Более того, за последние 50 лет крысы использовались почти в 6500 масштабных экспериментах, и только в 500 исследованиях задействованы другие животные [23].

Роль вторичных мессенджеров, нейротрансмиссии, тривиальных крысиных методик не отвечает современным вызовам инновационной медицины [25]. ПЭТ (позитронно-эмиссионная томография), эпигенетика, генная инженерия, пептидный, метаболомный анализ, нейровизуализация, микроминиатюризация в физикохимии и технике уже стоят на пути открытий [24].

Нейровизуализация прогрессивно внедряется в биологию и медицину. Например, с ее помощью удастся четко диагностировать неврологические нарушения, маскирующиеся под психические расстройства [17]. К методам нейровизуализации относятся: ПЭТ, ОФЭКТ (однофотонная эмиссионная компьютерная томография), фМРТ (функциональная магнитнорезонансная томография), МЭГ (магнитоэнцефалография), биохимические маркеры (например, TSPO с радиометкой, протеин-транслокатор) и др. Однако эти методы направлены на диагностику и никак не демонстрируют эффективность лечения, а тем более не раскрывают механизмы действия нейропсихотропных средств [17, 20].

В общем виде нейровизуализация включает в себя небольшой комплекс методов визуализации структуры, функции и биохимических параметров мозга или его частей [3]. Хотя эти методы и постепенно пополняются, однако вопросы нейровизуализации эффектов и механизмов действия нейропсихотропных средств нами рассматриваются впервые.

Существует представление, что нормализация — «это просто здравый смысл, а любой компетентный профессионал и сам «естественным образом» спроектирует полностью нормализованную базу данных (БД) без необходимости применять теорию» [14]. В то же время процесс преобразования отношений БД к виду, отвечающему нормальным формам, совсем не прост и называется нормализацией. Объем БД при нормализации обычно уменьшается [21, 33]. Не погружаясь в детали, следует отметить, что есть шесть основных нормальных БД. Цель нормализации в том и состоит, чтобы исключить избыточное дублирование данных и множество малозначимых допустимых значений [28] и результатов, далеко не всегда укладывающихся в устоявшиеся представления. Наши данные разрушают тривиальные представления, что, например, психостимуляторы оказывают лишь возбуждающее действие, а при введении нейролептика будет доминировать тотальное депримирующее действие. Сам характер изменения интрацентральных отношений делает картину психотропных эффектов мозаичной и непредсказуемой заранее.

В статье показано, что изменения параметров НЭМ, наблюдаемые при воздействии различных нейропсихоактивных средств, информативно и убедительно отражают активность анализируемых участков мозга и являются маркерами преобразований интрацентральных отношений головного мозга животных.

Различные отделы мозга реагируют на нейротропные средства в одних случаях однотипно, в других — разнонаправленно. Седативные средства, антидепрессанты, ноотропы и СИОЗС (доксиламин, сертралин, фенотропил) характеризуются фазностью действия, т.е. чередованием периодов активации и угнетения компетентных отделов головного мозга, а наркотизирующие и активирующие средства (ксилазин и кофеин соответственно) имеют более ста-

бильные эффекты в ЭГМ, отличаясь однонаправленностью действия в течение всего периода влияния, совпадающего с данными фармакодинамики и фармакокинетики.

Так, например, передний отдел гиппокампа формирует и контролирует активирующие реакции, а прореальная и поясная извилины, заднее ядро гипоталамуса — преимущественно депримирующие процессы.

Многокомпонентное действие седативных, снотворных, ноотропных препаратов (доксиламин, сертралин, фенотропил) связано с выраженной активностью σ -ритма (13–15 Гц), который, по мнению ряда авторов, характеризуется «сонными веретенами». В действии ксилазина, оказывающего наркотизирующее влияние, отмечается

выраженная активация γ -ритма на частотах около 54–55 Гц, а на фоне влияния психостимулятора кофеина — угнетение в области 50–60 Гц. Наблюдаемые сходства и различия с этими областями в общем графике ЭГ могут свидетельствовать об информативности получаемых данных в высоких частотных диапазонах, которые ранее слабо изучались.

Сопоставление наблюдаемых результатов с известными фармакодинамическими и фармакокинетическими параметрами тестируемых средств позволяет считать анализ ЭГМ с помощью инновационных технологий — нормализации электрограмм мозга (НЭМ) — перспективным методом биомедицинских и доклинических исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гнездицкий В.В. Обратная задача ЭЭГ и клиническая электроэнцефалография. — Таганрог: Изд-во ТРТУ, 2000. — 268 с.
2. Ефремова Т.Н., Куликов М.А. Хаотическая составляющая высокочастотной ЭЭГ человека в состоянии спокойного бодрствования // Журн. высш. нервн. деятельности. — 2002. — Т. 52, № 3. — С. 283–291.
3. Каркищенко Н.Н. Альтернативы биомедицины. Т. 2. Классика и альтернативы фармакотоксикологии. — М.: Изд-во ВПК, 2007. — 448 с.
4. Каркищенко Н.Н. Психонитропизм лекарственных средств. — М.: Медицина, 1993. — 208 с.
5. Каркищенко Н.Н. Фармакология системной деятельности мозга. — Ростов: Ростиздат, 1975. — 152 с.
6. Каркищенко Н.Н., Фокин Ю.В., Каркищенко В.Н., Табокова Л.А., Мокроусов М.И., Алимкина О.В. Конвергентная валидация интрацентральных отношений головного мозга животных // Биомедицина. — 2017. — № 3. — С. 16–39.
7. Каркищенко Н.Н., Фокин Ю.В., Каркищенко В.Н., Табокова 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. — С. 4–17.
8. Меклер А.А. Применение аппарата нелинейного анализа динамических систем для обработки сигналов ЭЭГ // В сб.: Актуальные проблемы современной математики: ученые записки. Т. 13 (вып. 2) / Под ред. проф. Калашникова Е.В. — СПб.: Изд-во ЛГУ, 2004. — С. 112–140.
9. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / Под ред. Н.Н. Каркищенко и др. — М.: Профиль-2С, 2010. — 358 с.
10. Цыган В.Н., Боголовский М.М., Миролюбов А.В. Электроэнцефалография / Под ред. М.М. Дьяконова. — СПб.: Наука, 2008. — С. 19–23.
11. Berger H. Über das Elektroencephalogramm des Menschen // Arch. Psychiat. — 1929. — No. 87. — Pp. 527–570.
12. Caton R. The electric currents of the brain // Brit. Med. J. — 1875. — No. 2. — P. 278.
13. Condray R., Morrow L.A., Steinhauer S.R., et al. Mood and behavioral symptoms in individuals with chronic solvent exposure // Psychiatry Res. — 2000. — No. 97(2–3). — Pp. 191–206.
14. Conway C.R., Sheline Y.I., Chibnall J.T., et al. Brain blood-flow change with acute vagus nerve stimulation in treatment-refractory major depressive disorder // Brain Stimul. — 2012. — No. 5(2). — Pp. 163–171.
15. Date C.J. Date on Database: Writing 2000–2006, Apress, 2006. — 566 p. 1-59059-746-x.
16. Dougherty D.D., Weiss A.P., Cosgrove G.R., et al. Cerebral metabolic correlates as potential predictors of response to anterior cingulotomy for treatment of major depression // J. Neurosurg. — 2003. — No. 99(6). — Pp. 1010–1017.
17. Drevets W.C., Savitz J., Trimble M. The subgenual anterior cingulate cortex in mood disorders // CNS Spectr. — 2008. — No. 13(8). — Pp. 663–681.
18. Filler A.G. The history, development, and impact of computed imaging in neurological diagnosis and neurosurgery: CT, MRI, DTI. Available from Nature Precedings // Neurosurgical Focus. — 2009.

19. Griebel G., Holmes A. 50 years of hurdles and hope in anxiolytic drug discovery // *Nature reviews drug discovery*. — 2013. — No. 12 (9). — Pp. 667–687.
20. Hyman S. Psychiatric Drug Development: Diagnosing a Crisis // *Cerebrum*. — 02.04.2019.
21. Itil T.M. Short pharmac EEG analysis by measure. — Oxford Press, 2005. — 314 p.
22. Jeeves M. Mind Fields: Reflections on the Science of Mind and Brain // Grand Rapids, MI: Baker Books. — 1994. — No. 134. — P. 21.
23. Kito S., Hasegawa T., Koga Y. Cerebral blood flow ratio of the dorsolateral prefrontal cortex to the ventromedial prefrontal cortex as a potential predictor of treatment response to transcranial magnetic stimulation in depression // *Brain Stimul.* — 2012. — No. 5(4). — Pp. 547–553.
24. Kreisl W.C., Fujita M., Fujimura Y., et al. Comparison of [(11)C]-(R)-PK 11195 and [(11)C]PBR28, two radioligands for translocator protein (18 kDa) in human and monkey: Implications for positron emission tomographic imaging of this inflammation biomarker // *Neuroimage*. — 2010. — No. 49(4). Pp. 2924–2932.
25. Kreisl W.C., Lyoo C.H., McGwier M., et al. Biomarkers Consortium PET Radioligand Project Team. In vivo radioligand binding to translocator protein correlates with severity of Alzheimer's disease // *Brain: J. Neurol.* — No. 136. — Pp. 2228–2238.
26. Liu G.J., Middleton R.J., Hatty C.R., et al. The 18 kDa translocator protein, microglia and neuroinflammation // *Brain Pathol.* — 2014. — No. 24(6). — Pp. 631–653.
27. Masdeu J.C. Neuroimaging in psychiatric disorders // *Neurotherapeutics*. — 2011. — No. 8(1). — Pp. 93–102.
28. Nagafusa Y., Okamoto N., Sakamoto K., et al. Assessment of cerebral blood flow findings using 99mTc-ECD single-photon emission computed tomography in patients diagnosed with major depressive disorder // *J. Affect. Disord.* — 2012. — No. 140(3). — Pp. 296–299.
29. Nilsson L.-G., Markowitsch H.J. Cognitive Neuroscience of Memory. — Seattle: Hogrefe & Huber Publishers, 1999. — P. 57.
30. Polunina A.G., Davydov D.M. EEG correlates of Wechsler Adult Intelligence Scale // *Int. J. Neurosci.* — 2006. — No. 116(10). — Pp. 1231–1248.
31. Postuma R.B., Aarsland D., Barone P., et al. Identifying prodromal Parkinson's disease: pre-motor disorders in Parkinson's disease // *Mov. Disord.* — 2012. — No. 27(5). — Pp. 617–626.
32. Price J.L., Drevets W.C. Neural circuits underlying the pathophysiology of mood disorders // *Trends Cogn. Sci.* — 2012. — No. 16(1). — Pp. 61–71.
33. Sehm B., Schnitzler T., Obleser J., Groba A., Ragert P., Villringer A., Obrig H. Facilitation of inferior frontal cortex by transcranial direct current stimulation induces perceptual learning of severely degraded speech // *J. Neurosci.* — 2013. — No. 33(40). — Pp. 15868–15878. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5466-12.2013
34. Smith K. Mind-reading with a brain scan // *Nature News*. — 2008.
35. Stella F., Radanovic M., Balthazar M.L., et al. Neuropsychiatric symptoms in the prodromal stages of dementia // *Curr. Opin Psychiatry*. — 2014. — No. 27(3). — Pp. 230–235.
36. Thornton J.F., Schneider H., McLean M.K., et al. Improved outcomes using brain SPECT-guided treatment versus treatment-as-usual in community psychiatric outpatients: a retrospective case-control study // *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* — 2014. — No. 26(1). — Pp. 51–56.
37. Willeumier K., Taylor D.V., Amen D.G. Decreased cerebral blood flow in the limbic and prefrontal cortex using SPECT imaging in a cohort of completed suicides // *Transl. Psychiatry*. — 2011. — No. 1. — P. e28.

REFERENCES

1. Gnezdickij V.V. Obratnaya zadacha EhEhG i klinicheskaya ehlektroehncefalografiya [Reverse EEG problem and clinical electroencephalography]. Taganrog: Izd-vo TRTU, 2000. 268 p. (In Russian).
2. Efremova T.N., Kulikov M.A. Haoticheskaya sostavlyayushchaya vysokochastotnoj EhEhG cheloveka v sostoyanii spokojnogo boдрstvovaniya [Chaotic component of the high-frequency EEG of a person in a state of calm wakefulness]. Zhurn. vyssh. nervn. deyatel'nosti [J. of Higher Nervous Activity]. 2002. Vol. 52, No. 3. Pp. 283–291. (In Russian).
3. Karkischenko N.N. Al'ternativy biomeditsiny. T. 2. Klassika i al'ternativy farmakotoksikologii [Alternatives to biomedicine. Vol. 2. Classics and alternatives to pharmacotoxicology]. Moscow: Izd-vo VPK, 2007. 448 p. (In Russian).
4. Karkischenko N.N. Psihounitropizm lekarstvennykh sredstv [Psychunitropism of medicines]. Moscow: Medicina, 1993. 208 p. (In Russian).
5. Karkischenko N.N. Farmakologiya sistemnoj deyatel'nosti mozga [Pharmacology of systemic activity of the brain]. Rostov: Rostizdat, 1975. 152 p. (In Russian).
6. Karkischenko N.N., Fokin Yu.V., Karkischenko V.N., Taboyakova L.A., Mokrousov M.I., Alimkina O.V. Konvergentnaya validatsiya intratsentral'nykh otnoshenij golovnogo mozga zhivotnykh [Convergent validation of intracental relationships of the brain of animals]. Biomedicine. 2017. No. 3. Pp. 16–39. (In Russian).
7. Karkischenko N.N., Fokin Yu.V., Karkischenko V.N., Taboyakova L.A., Kharitonov S.Yu., Alimkina O.V.

- Novye podhody k otsenke intracental'nyh otnoshenij po pokazatelyam operantnogo povedeniya i ehlektrogramm mozga koshek [New approaches to the assessment of intracental relations in terms of operant behavior and electrograms of the cats brain]. Biomedicine. 2018. No. 4. Pp. 4–17. (In Russian).
8. Mekler A.A. Primenenie apparata nelinejnogo analiza dinamicheskikh sistem dlya obrabotki signalov EhEhG [The use of the apparatus for nonlinear analysis of dynamic systems for EEG signal processing]. V sb.: Aktual'nye problemy sovremennoj matematiki: uchenye zapiski. T. 13 (vyp. 2) [In the collection: Actual problems of modern mathematics: scientific notes. Vol. 13 (Issue 2)]. Ed. by prof. Kalashnikov E.V. Saint Petersburg: Izd-vo LGU, 2004. Pp. 112–140. (In Russian).
9. Rukovodstvo po laboratornym zhivotnym i al'ternativnym modelyam v biomedicinskih issledovaniyah [Manual on laboratory animals and alternative models in biomedical research]. Ed. by N.N. Karkischenko, et al. Moscow: Profil'-2S, 2010. 358 p. (In Russian).
10. Tsygan V.N., Bogolovskij M.M., Mirolyubov A.V. Ehlektroehncefalografiya [Electroencephalography]. Ed. by M.M. D'yakonov. Saint Petersburg: Nauka, 2008. Pp. 19–23. (In Russian).
11. Berger H. Über das Elektrenkephalogramm des Menschen. Arch. Psychiat., 1929. No. 87. Pp. 527–570.
12. Caton R. The electric currents of the brain. Brit. Med. J., 1875. No. 2. P. 278.
13. Condray R., Morrow L.A., Steinhauer S.R., et al. Mood and behavioral symptoms in individuals with chronic solvent exposure. Psychiatry Res. 2000. No. 97(2–3). Pp. 191–206.
14. Conway C.R., Sheline Y.I., Chibnall J.T., et al. Brain blood-flow change with acute vagus nerve stimulation in treatment-refractory major depressive disorder. Brain Stimul. 2012. No. 5(2). Pp. 163–171.
15. Date C.J. Date on Database: Writing 2000–2006, Apress, 2006. 566 p. 1-59059-746-x.
16. Dougherty D.D., Weiss A.P., Cosgrove G.R., et al. Cerebral metabolic correlates as potential predictors of response to anterior cingulotomy for treatment of major depression. J. Neurosurg. 2003. No. 99(6). Pp. 1010–1017.
17. Drevets W.C., Savitz J., Trimble M. The subgenual anterior cingulate cortex in mood disorders. CNS Spectr. 2008. No. 13(8). Pp. 663–681.
18. Filler A.G. The history, development, and impact of computed imaging in neurological diagnosis and neurosurgery: CT, MRI, DTI. Available from Nature Precedings. Neurosurgical Focus. 2009.
19. Griebel G., Holmes A. 50 years of hurdles and hope in anxiolytic drug discovery. Nature reviews drug discovery. 2013. No. 12 (9). Pp. 667–687.
20. Hyman S. Psychiatric Drug Development: Diagnosing a Crisis. Cerebrum. 02.04.2019.
21. Itil T.M. Short pharmac EEG analysis by measure. — Oxford Press, 2005. 314 p.
22. Jeeves M. Mind Fields: Reflections on the Science of Mind and Brain. Grand Rapids, MI: Baker Books. 1994. No. 134. P. 21.
23. Kito S., Hasegawa T., Koga Y. Cerebral blood flow ratio of the dorsolateral prefrontal cortex to the ventromedial prefrontal cortex as a potential predictor of treatment response to transcranial magnetic stimulation in depression. Brain Stimul. 2012. No. 5(4). Pp. 547–553.
24. Kreisl W.C., Fujita M., Fujimura Y., et al. Comparison of [(11)C]-(R)-PK 11195 and [(11)C]PBR28, two radioligands for translocator protein (18 kDa) in human and monkey: Implications for positron emission tomographic imaging of this inflammation biomarker. Neuroimage. 2010. No. 49(4). Pp. 2924–2932.
25. Kreisl W.C., Lyoo C.H., McGwier M., et al. Biomarkers Consortium PET Radioligand Project Team. In vivo radioligand binding to translocator protein correlates with severity of Alzheimer's disease. Brain: J. Neurol. No. 136. Pp. 2228–2238.
26. Liu G.J., Middleton R.J., Hatty C.R., et al. The 18 kDa translocator protein, microglia and neuroinflammation. Brain Pathol. 2014. No. 24(6). Pp. 631–653.
27. Masdeu J.C. Neuroimaging in psychiatric disorders. Neurotherapeutics. 2011. No. 8(1). Pp. 93–102.
28. Nagafusa Y., Okamoto N., Sakamoto K., et al. Assessment of cerebral blood flow findings using 99mTc-ECD single-photon emission computed tomography in patients diagnosed with major depressive disorder. J. Affect Disord. 2012. No. 140(3). Pp. 296–299.
29. Nilsson L.-G., Markowitsch H.J. Cognitive Neuroscience of Memory. — Seattle: Hogrefe & Huber Publishers, 1999. P. 57.
30. Polunina A.G., Davydov D.M. EEG correlates of Wechsler Adult Intelligence Scale. Int. J. Neurosci. 2006. No. 116(10). Pp. 1231–1248.
31. Postuma R.B., Aarsland D., Barone P., et al. Identifying prodromal Parkinson's disease: pre-motor disorders in Parkinson's disease. Mov. Disord. 2012. No. 27(5). Pp. 617–626.
32. Price J.L., Drevets W.C. Neural circuits underlying the pathophysiology of mood disorders. Trends Cogn. Sci. 2012. No. 16(1). Pp. 61–71.
33. Sehm B., Schnitzler T., Obleser J., Groba A., Ragert P., Villringer A., Obrig H. Facilitation of inferior frontal cortex by transcranial direct current stimulation induces perceptual learning of severely degraded speech. J. Neurosci. 2013. No. 33(40). Pp. 15868–15878. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5466-12.2013
34. Smith K. Mind-reading with a brain scan. Nature News. 2008.
35. Stella F., Radanovic M., Balthazar M.L., et al. Neuropsychiatric symptoms in the prodromal stages of dementia. Curr. Opin Psychiatry. 2014. No. 27(3). Pp. 230–235.
36. Thornton J.F., Schneider H., McLean M.K., et al. Improved outcomes using brain SPECT-guided treat-

ment versus treatment-as-usual in community psychiatric outpatients: a retrospective case-control study. J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci. 2014. No. 26(1). Pp. 51–56.

37. Willeumier K., Taylor D.V., Amen D.G. Decreased cerebral blood flow in the limbic and prefrontal cortex using SPECT imaging in a cohort of completed suicides. Transl. Psychiatry. 2011. No. 1. P. e28.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Каркищенко Николай Николаевич*, д.м.н., проф., акад. РАН, чл.-корр. РАН, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;

e-mail: niknik2808@yandex.ru

Nikolay N. Karkischenko*, Dr. Sci. (Med.), Prof., Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, supervisor, “Scientific Center for Biomedical Technology of the Federal Medical and Biological Agency”;

e-mail: niknik2808@yandex.ru

Каркищенко Владислав Николаевич, д.м.н., проф., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;

e-mail: scbmt@yandex.ru

Vladislav N. Karkischenko, Dr. Sci. (Med.), Prof., Director, “Scientific Center for Biomedical Technology of the Federal Medical and Biological Agency”;

e-mail: scbmt@yandex.ru

Фокин Юрий Владимирович, к.б.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;

e-mail: fokin-yuri@yandex.ru

Yuriy V. Fokin, PhD Sci. (Biol.), “Scientific Center for Biomedical Technology of the Federal Medical and Biological Agency”;

e-mail: fokin-yuri@yandex.ru

Харитонов Сергей Юрьевич, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;

e-mail: scbmt@yandex.ru

Sergey Yu. Kharitonov, “Scientific Center for Biomedical Technology of the Federal Medical and Biological Agency”;

e-mail: scbmt@yandex.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ В ИДЕНТИФИКАЦИИ БЕЛКОВЫХ КОМПОНЕНТОВ ПРЕПУЦИАЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КАБАРГИ СИБИРСКОЙ

В.Н. Каркищенко, М.С. Дуля*, Д.В. Хвостов, Р.А. Агельдинов, С.Л. Люблинский

ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий
Федерального медико-биологического агентства России»
143442, Российская Федерация, Московская обл., Красногорский р-н,
п. Светлые горы, владение 1

Данные белкового компонентного состава мускуса и тканей кабарги представлены в научной литературе малоизученными и неполноценными. В данной работе выполнено протеомное исследование белкового состава биологически активных компонентов экстрактов препуциальной железы кабарги сибирской методами гель-размерной эксклюзионной хроматографии (ГРХ) и пептидного картирования методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС) высокого разрешения после ферментативного расщепления трипсином. Это эффективные методы для получения достоверных данных белкового состава тканей кабарги сибирской, которые обращают пристальное внимание на белковую фракцию мускуса кабарги как источник биологически активных компонентов. Установлено молекулярно-массовое распределение, характерное для белковых экстрактов препуциальной железы кабарги сибирской. Выявлены оптимальные условия экстракции, хроматографического разделения и относительного количественного соотношения главных белковых компонентов. Подробно представлены результаты идентификации наиболее значимых (мажорных и минорных) белковых компонентов в экстрактах изучаемых объектов в соответствии с алгоритмом поисковой программы Spectrum Mill MS Proteomics Workbench и белковой базой данных Uniprot. Данные белкового профилирования кластеризованы по молекулярным и биологическим функциям. Отображены связи идентифицированных белков с возможными механизмами биологического действия и мишенями, на которые могут оказывать воздействие белковые компоненты изучаемых объектов. По результатам исследования сделаны выводы о многокомпонентности белкового состава экстрактов препуциальной железы кабарги сибирской. Предложены маркерные белковые компоненты в составе изучаемых экстрактов и указаны возможные взаимосвязи обнаруженных белков в составе экстрактов с биологическими эффектами.

Ключевые слова: ВЭЖХ-МС, гель-размерная хроматография, мускус кабарги, пептидное картирование, PNOС

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Каркищенко В.Н., Дуля М.С., Хвостов Д.В., Агельдинов Р.А., Люблинский С.Л. Протеомный анализ в идентификации белковых компонентов препуциальной железы кабарги сибирской. *Биомедицина*. 2019;15(1):35–47. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-1-35-47>

Поступила 07.02.2019

Принята после доработки 11.02.2019

Опубликована 10.03.2019

PROTEOMIC ANALYSIS IN THE IDENTIFICATION OF ACTIVE COMPONENTS IN THE PREPUTIAL GLAND SECRETION OF THE SIBERIAN MUSK DEER

Vladislav N. Karkischenko, Maxim S. Dulya*, Daniil V. Khvostov,
Ruslan A. Ageldinov, Stanislav L. Lyublinskiy

*Scientific Center of Biomedical Technologies
of the Federal Medical Biological Agency of Russia
143442, Russian Federation, Moscow region, Krasnogorsk,
Settlement Svetlye Gory, building 1*

The Siberian musk deer (*Moschus Moschiferus*) is a deer-like animal. The substance that is secreted by sexually mature males is highly valued worldwide for its perceived pharmaceutical and perfumery properties. However, there is a lack of comprehensive information regarding the component composition of the musk and tissues of this species. A complex study of the protein composition of biologically active components in the preputial gland secretion of the Siberian musk deer was performed using the methods of size-exclusion chromatography and peptide mapping. The latter method was realized using high-performance liquid chromatography tandem mass-spectrometric detection following fermentation by trypsin. These are effective methods for generating vast amounts of data that can facilitate research on the Siberian musk deer. A molecular weight distribution characteristic of the investigated extracts was established. Optimal conditions for the extraction, chromatographic separation and relative quantitative determination of the main musk components were determined. Detailed information on the most significant (major and minor) protein components in the studied samples is presented in accordance with the algorithm of the Spectrum Mill MS Proteomics Workbench search program and the UniProt protein database. Protein profiling data was clustered according to their molecular and biological functions. The identified proteins were assessed in terms of possible mechanisms of biological action and targets, which can be affected by the protein components of the objects under the study. A conclusion is made about a multicomponent composition of the Siberian musk deer preputial gland secretion. Marker protein components in the studied extracts are suggested. Possible links between the identified proteins and biological effects are outlined.

Keywords: HPLC-MS, musk, peptide mapping, SEC, PNOC

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

For citation: Karkischenko V.N., Dulya M.S., Khvostov D.V., Ageldinov R.A., Lyublinskiy S.L. Proteomic Analysis in the Identification of Active Components in the Preputial Gland Secretion of the Siberian Musk Deer. *Biomedicine*. 2019;15(1):35–47. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-1-35-47>

Submitted 07.02.2019

Revised 11.02.2019

Published 10.03.2019

Введение

Кабарга сибирская (*Moschus moschiferus*) является оленевидным животным. Мускус, выделяемый половозрелыми самцами, высоко ценится во всем мире за выраженные фармацевтические свойства и возможность использования в парфюмерии. Биоаналитические данные компонентного состава муску-

са кабарги представлены в научной литературе малоизученными и неполноценными.

Ранее авторами была предложена методика развернутой идентификации низкомолекулярных биологически активных компонентов в составе препуциальной железы кабарги сибирской (ПЖК) методом газовой хроматографии с масс-селективным

детектором с применением современных методических приемов пробоподготовки, экстракции и дериватизации [1]. Были установлены оптимальные условия экстракции, хроматографического разделения и относительного количественного определения главных летучих компонентов ПЖК в условиях лиофильного высушивания с сохранением многокомпонентного спектра активных компонентов. Согласно установленному в ранней работе составу ПЖК нами предложено выделить 3 группы соединений, значимых с точки зрения биологического эффекта и его выраженности: 1) стероидные компоненты, 2) жирные кислоты, 3) пептиды и белки.

Широкий спектр показаний к применению экстрактов мускуса [5] является следствием описанного в предыдущей работе многокомпонентного состава ткани. В изучаемом материале особое внимание стоит обратить на регуляторные соединения пептидной природы, гормонально активные комплексы и ростовые факторы, в т.ч. активирующие жизненный цикл стволовых клеток [2, 4]. Регуляторные пептиды (РП), как известно, играют жизненно важную роль в различных системах контроля многих биологических процессов организма. Они могут сосуществовать с классическими медиаторами, модулируя и усиливая их активность. Каждый из пептидов, с одной стороны, обладает уникальными свойствами, а с другой стороны, имеет перекрывающийся с остальными РП спектр биоактивностей. В совокупности все множество РП организма образует эффективный функциональный пул, решающий огромное число задач, связанных с процессами регуляции и контроля. При этом большинство из них способны индуцировать и ингибировать активность и производство других РП, формируя данным образом разветвленную, взаимосопряженную систему регуляции биологических функций.

Трудность систематизации и анализа результатов экспериментальных данных при

изучении пептидов и белков обусловлена тем, что число известных РП животных и человека превышает уже 9000. Акцентирование внимания на выявлении пептидных взаимосвязей позволяет провести анализ структурно-функциональных закономерностей совокупности РП и дает теоретические обоснования для применения данных комплексов и их аналогов в качестве терапевтических агентов и лекарственных средств [2, 4, 8].

В мировом научном сообществе известны работы по выявлению взаимодействующих пар белков, ассоциированных с нейродегенеративными заболеваниями, серповидноклеточной анемией, шизофренией и др. Картирование интерактомов нейродегенеративных заболеваний, таких как болезни Альцгеймера, Паркинсона и Хантингтона, амиотропный латеральный склероз, а также прионовые болезни, позволило выявить, что белки, ассоциированные с этими заболеваниями, характеризуются наличием общих взаимодействующих партнеров.

Изучение белок-белковых взаимодействий и выявление участвующих в данном процессе партнеров, специфичных для той или иной патологии, представляет собой важный инструмент в изучении механизмов возникновения и развития заболеваний, поиска биологических активных веществ и регуляторов в сложных источниках белков, которым и является выбранный объект исследования. В дополнение ко всему вышесказанному структурно-функциональная информация о пептидах растительного и животного происхождения важна для системной биологии, может также использоваться в различных прикладных областях, в сельском хозяйстве, в производстве диетических продуктов, фармацевтических препаратов, продуктах функционального питания [4, 8]. Например, растительный пептид луназин, выделенный из сои и ячменя, обладает антионкогенным действием. Короткие растительные пептиды группы

циклотидов, обладающие инсектицидным действием, имеют также другие биологические эффекты: снимают нервное напряжение, нарушают репликацию вируса иммунодефицита, обладают гемолитической и цитотоксической активностью. Все это указывает на наличие потенциала и у растительных пептидов в области разработки лекарств.

Актуальность исследования

Методы систематического, количественного и идентификационного изучения пептидов, содержащихся в живых клетках и тканевых жидкостях, в области биомедицинских исследований в большинстве своем сосредоточены на изучении и создании новейших лекарственных препаратов, формирующихся из результатов поиска индикаторных и эффективных комбинаций различных субстанций пептидов и/или белков и их идентификации, для последующего использования в диагностике, эффективной терапии и применении их как функциональных продуктов питания.

Оказывается весьма парадоксальным тот факт, что при наличии достаточно продолжительной истории применения изучаемых экстрактов и субпродуктов из тканей кабарги многоя информация, касающаяся компонентного состава мускуса и тканей представителей данного вида, по-прежнему представляется малоизученной и неполноценной. Надежно не идентифицированы компоненты, ассоциированные с широким спектром биологической активности данных тканей. Однако благодаря вкладу многих ученых, в т.ч. лаборатории биоаналитических исследований НЦБМТ ФМБА России, на сегодняшний день известно, что в состав экстрактов из ПЖК входит огромное число соединений различной природы [1, 12, 10]. Следующим логичным этапом в рамках цикла данных исследовательских работ предстает изучение пептидно-белкового состава изучаемых тканей. Предпо-

лагается, что с помощью идентификации пептидно-белкового состава могут быть охарактеризованы многие виды биологической активности субстанции и препаратов на основе экстрактов и субпродуктов изучаемых тканей.

Анализируемые объекты представляют собой многокомпонентные белково-пептидные комплексы. Использование ряда методов с применением хроматографического фракционирования позволяет получить данные о количественном и качественном составе белкового профиля с визуализацией пула белков изучаемых экстрактов.

Цель исследования

Целью исследования стала расшифровка белкового профиля и идентификация биологически активных соединений пептидно-белковой фракции из ПЖК.

Задачи состояли в разработке методов пробоподготовки экстрактов исследуемых тканей в различных условиях, подборе методик для дальнейшего белкового профилирования и их идентификации в нативном сырье и лиофилизатах препуциальной железы кабарги сибирской методами гель-размерной эксклюзионной хроматографии (ГРХ) и высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС) после ферментативного гидролиза трипсином.

Материалы и методы

Образцы экстрактов ПЖК были получены из коллекции лаборатории биоаналитических исследований НЦБМТ ФМБА России. Они были выделены методами гомогенизации под высоким давлением, тангенциального фракционирования в условиях технологии водно-спиртовой экстракции и последующей лиофилизации.

Материалы исследования

В работе использовались следующие реактивы и материалы (Sigma, США): спирт

этиловый, ортофосфорная кислота, натрия хлорид, натриевая соль дезоксихолевой кислоты, трис(гидроксиметил)-аминометан, 1 М р-р дитиотреитола, 1 мМ р-р соляной кислоты, трипсин из свиной поджелудочной железы, эндопротеиназа Lys-C из *Lysobacter enzymogenes*. Раствор бычьего сывороточного альбумина (Bio-Rad, США). Фильтры центрифужные с диаметром пор 0,22 мкм в комплекте с микроцентрифужными пробирками вместимостью 2,0 мл — для ферментативного расщепления; калибровочный р-р для ВЭЖХ-МС ВР — для калибровки масс-спектрометра. А также: ацетонитрил для градиентной ВЭЖХ, метанол для ВЭЖХ (все — Merck, Германия); муравьиная кислота (Fluka, Германия) — для приготовления подвижных фаз.

Все растворители и реагенты были аналитической степени чистоты, растворы для подготовки проб готовили с использованием деионизованной воды.

ВЭЖХ-МС/МС ВР анализ проводили с использованием жидкостного хроматографа модели 1260 Infinity II Agilent Technologies, оснащенного насосом, двухканальным дегазатором, оборудованного системой автоматического ввода пробы Multisampler 1260 Analytical head 100 µl с масс-спектрометрическим детектором QTOF 6545XT с электрораспылительной ионизацией Dual Jet Stream (Agilent Technologies, США), хроматографическая колонка Advance Bio Peptide Mapping длиной 150 мм и внутренним диаметром 2,1 мм, размер сорбента 2,7 мкм (Agilent Technologies, США).

ГРХ-анализ выполняли на хроматографической системе среднего давления NGC Discover (Bio-Rad, США), оснащенной многоволновым спектрофотометрическим детектором, датчиком pH элюента, кондуктометрической ячейкой и хроматографической колонкой для ГРХ высокого разрешения Enrich SEC 650, в качестве калибровочных стандартов с известными

молекулярными массами использовали Gel Filtration Standard (Bio-Rad, США).

Идентификацию белкового состава проводили с использованием базы данных полипептидных последовательностей UniProt в сети Интернет (<https://www.uniprot.org>) и программы для сбора и обработки данных Spectrum Mill MS Proteomics Workbench (Agilent, США).

Методы исследования

Определение общего белка проводили по методу Бредфорда без предварительного осаждения белка в соответствии с ГФ РФ, ОФС.1.2.3.0012.15, «Определение» белка. Образцы нативной ткани и лиофилизатов экстракта мускуса кабарги предварительно растворяли в воде, очищенной до концентрации 150 мг/мл в соответствующем объеме растворителя. Содержание белка определяли по калибровочной кривой для р-ра бычьего сывороточного альбумина.

Молекулярно-массовое фракционирование продукта проводили на жидкостном ионнообменном хроматографе высокого давления со спектрофотометрическим проточным детектором с длиной волны 280 нм с помощью соответствующей хроматографической колонки, предварительно откалиброванной по стандартным глобулярным водорастворимым белкам известной молекулярной массы (рис. 1, табл. 1). При проведении исследования определяли суммарное содержание всех белков, а также отдельных белков (пептидов) с соответствующими молекулярными массами. Далее анализировали соотношение суммы белков в диапазоне калибровочных молекулярных масс к общему их количеству и делали заключение о молекулярно-массовом распределении белков и пептидов в анализируемом продукте.

Анализ на жидкостном хроматографе Agilent Technologies 1260 Infinity II проводили в режиме AutoMSMS. Хроматографическая колонка AdvanceBio Peptide Mapping, предколонка ZORBAX Extend-C18 Narrow-

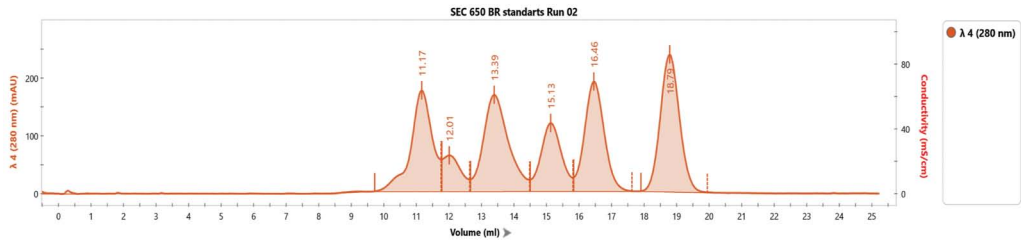


Рис. 1. Хроматограмма калибровочных стандартов по молекулярной массе для ГРХ.

Fig. 1. Chromatogram of the calibrated standards in terms of molecular mass for size exclusion chromatography.

Таблица 1. Калибровочная таблица для ГРХ

Table 1. Calibration table for size exclusion chromatography

Название пика	V _r , мл	V _c , мл	V _o , мл	K _{av}	Молекулярная масса, Да
Thyroglobulin	11,17	23,56	8	0,20	670 000
γ-globulin	13,39	23,56	8	0,35	158 000
Ovalbumin	15,13	23,56	8	0,46	44 000
Myoglobin	16,46	23,56	8	0,54	17 000
Vitamin B ₁₂	18,79	23,56	8	0,69	1350

Примечания: V_r — объем выхода с колонки пробы, V_c — объем колонки, V_o — «мертвый» объем колонки, K_{av} рассчитывается для каждого известного белка путем подстановки экспериментально определенных значений V_o, V_c и V_r в формулу: $K_{av} = (V_r - V_o) / (V_t - V_o)$.

Notes: V_r is the output volume from the sample column, V_c is the column volume, V_o is the “dead” column volume, K_{av} is calculated for each known protein by substituting experimentally determined values of V_o, V_c and V_r into the formula: $K_{av} = (V_r - V_o) / (V_t - V_o)$.

Bore Guard Column. Элюирование осуществляли смесью, состоящей из компонентов А и В, в градиентном режиме: до 0,5 мин — 5%B, с 0,5 до 15 мин увеличивается до 35%B, с 17 мин — до 95% и удерживается в течение 13 мин, с 30,01 мин — возвращается в исходные условия. Время уравнивания колонки на исходных условиях — 5 мин. Компонент А представлял собой 0,1% р-р муравьиной кислоты в деионизированной воде, компонент В — 0,1% р-р муравьиной кислоты и 10% деионизированной воды в ацетонитриле. Скорость потока — 400 мкл/мин, длительность анализа составила 30 мин. Условия масс-спектрометрического детектирования приведены в табл. 2.

Результаты и их обсуждение

Определение общего белка

Процентное содержание белка в изучаемых экстрактах демонстрирует, что среднестатистическое содержание белка в экстрактах равно 3,2%, а дисперсия при этом равняется 0,98 (данные не приведены). В присутствии детергента дисперсия остается практически неизменной, а содержание белка в растворе увеличивается на 1%. Расчеты были проведены с применением программного обеспечения Microsoft Excel.

Гель-размерная хроматография

Результаты ГРХ свидетельствуют о низкомолекулярном пептидо-белковом профиле водных экстрактов ПЖК. Диапазон

Таблица 2. Условия масс-спектрометрического детектирования
Table 2. Conditions for mass spectrometric detection

Наименование параметра	Значение
Масс-спектрометрический детектор	QTOF 6545XT
Режим источника ионизации	Dual Agilent Jet Stream Electrospray Ionization (Dual AJS ESI)
Разрешающая способность	60 000
Тип ячейки соударительной диссоциации	Ячейка соударительной диссоциации
Энергия ионизации	(30±15)%
Детектируемое зарядовое состояние	2-5
Режим сканирования	AutoMSMS
Диапазон детектируемых масс	100-2100
Полярность детектируемых ионов	Детектирование положительных ионов
Напряжение на распылителе	3,5 кВ
Напряжение фрагментора	175 В
Скорость потока газа-осушителя	13 л/мин
Давление газа на небулайзере	35 psig
Температура распылителя	250 °C

представленного распределения выходит за рамки разрешающей способности электрофореза.

Идентификация по молекулярной массе была проведена с использованием программного обеспечения ChromLab (BioRad, США) (рис. 2) и проанализирована с помощью Microsoft Excel. В исследованном образце было выделено 5 маркерных участков с молекулярными массами, представленными в табл. 3.

Данные хроматограммы свидетельствуют о большом скоплении белков с массой до 3 кДа, что говорит о значительном коли-

честве низкомолекулярных белков и олигопептидов. Доля белков с большими молекулярными массами составляет не более 5%.

ВЭЖХ-МС

В методологической основе протеомного анализа (качественного и количественного) лежит масс-спектрометрия пептидов, которая в наши дни активно развивается и совершенствуется [3].

Результатом расшифровки белкового профиля фракции из ПЖК и их классификации стали аннотированные группы белков, представленные на рис. 3 и 4.

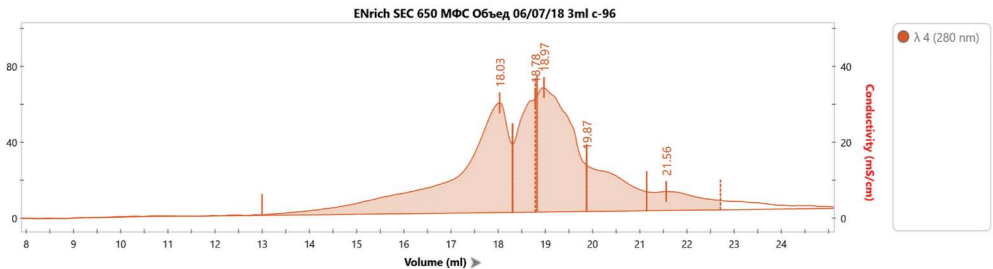


Рис. 2. Гель-размерная хроматография водного р-ра экстракта мускуса кабарги ПЖК.
Fig. 2. Size-exclusion chromatography of the aqueous solution of musk extract obtained from the preputial gland of musk deer.

Таблица 3. Молекулярно-массовое распределение белкового профиля экстракта ПЖК

Table 3. Molecular weight distribution of the protein profile of the preputial glandular extract obtained from musk deer

Номер пика	Vr, мл	Vс, мл	Vo, мл	Kав	Отн. содержание, %	Молекулярная масса, кДа
1	18,03	23,56	8	0,64	40,18	2,8
2	18,78	23,56	8	0,69	13,00	1,6
3	18,97	23,56	8	0,71	28,33	1,3
4	19,87	23,56	8	0,76	11,78	0,7
5	21,56	23,56	8	0,87	6,71	0,2

ВЭЖХ-МС анализ после ферментативного гидролиза трипсином продемонстрировал идентификацию большого числа белковых компонентов. Полученные данные были проанализированы в базе данных UniProt. Заслуживает пристального внимания разнообразие функций и биологических ролей выявленных белковых компонентов мускуса кабарги. Суммарно из фракции ПЖК было идентифицировано 66 белковых компонентов различной природы, из которых 15 на момент анализа считались устаревшими и не были подвергнуты анализу ранее.

Приведенные диаграммы демонстрируют общие направления функций и процессов с привлечением и участием идентифицированных белков. На рис. 3, 4 и в табл. 4 отображены наиболее яркие представители изучаемых профилей с наибольшим индексом сходства.

В классификации по молекулярным функциям белковых компонентов из фракции ПЖК преобладают три направления: гидролазы, оксиредуктазы и трансферазы. По вовлеченности в биологические процессы преобладают следующие направления: биогенез/деградация клеточной стенки, транскрипция, деление клеток. Приведенные в табл. 4 результаты составляют лишь незначительную часть проанализированных белковых компонентов, однако они являются одними из известных и значимых среди них.

Особенно примечательно, что в экстрактах из ПЖК был идентифицирован

предшественник нейропептидов, которые являются природными агонистами ноцицептинового опиоидного рецептора NOP (ORL1). Данный белок носит название пре-проноцицептин (PNOC) и является предшественником ноцистатина, ноцицептина и орфанина FQ2. Первое упоминание о нем было опубликовано менее 30 лет назад и задает направление будущих исследований в отрасль нейрофизиологии [9]. Нейропептид ноцицептин является эндогенным лигандом рецептора NOP и индуцирует гипералгезию, аллодинию, тревожность и депрессию. Его предшественник также содержит и другой биологически активный пептид, который блокирует ноцицептин-индуцированные эффекты [11]. Таким образом, идентифицированный предшественник содержит два пептида, которые играют противоположные роли в передаче болевых сигналов. Терапевтический потенциал использования продуктов созревания PNOC демонстрируется и в современных исследованиях. Так, например, группой зарубежных ученых был обнаружен бифункциональный агонист рецепторов NOP и μ -(мю) опиоидного рецептора MOR [6]. Низкомолекулярный лиганд AT-121 рассматривается как молекула-кандидат к PNOC и демонстрирует морфиноподобные анальгетические эффекты, при этом не вызывая побочных эффектов (депрессия, зависимость, гипералгезия). Также в литературе присутствуют многочисленные упоминания о вовлеченности данных пептидов в процессы стресса, обучения и памяти.



Рис. 3. Группы белков из экстрактов ПЖК, распределенные по молекулярным функциям (использована база белковых данных Uniprot).

Fig. 3. Groups of proteins in the preputial glandular extracts of musk deer, distributed by their molecular functions (using the Uniprot protein database).

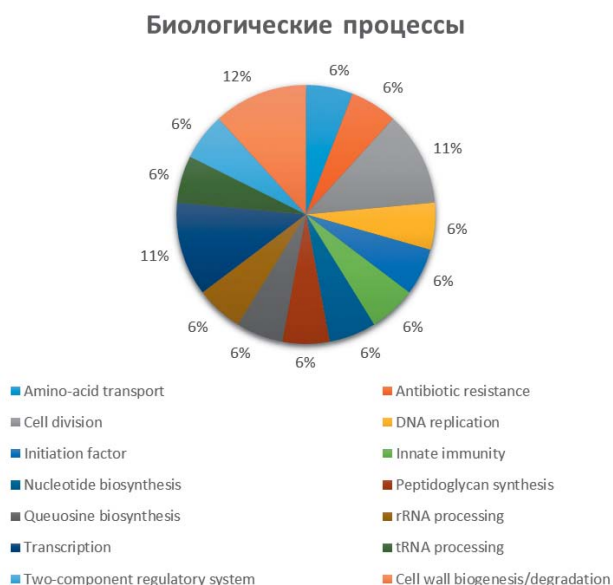


Рис. 4. Группы белков из экстрактов ПЖК, распределенные по биологическим процессам (использована база белковых данных Uniprot).

Fig. 4. Groups of proteins in the preputial glandular extracts of musk deer, distributed by their biological processes (using the Uniprot protein database).

Таблица 4. Молекулярно-массовые характеристики некоторых типичных аннотированных белков в составе экстракта ПЖК

Table 4. Molecular mass characteristics of some typical annotated proteins in the preputial glandular extracts of musk deer

Номер аннотир. белка	MS/MS Score	Покрывтие а. п.	Общая спектральная интенсивность	Мол. масса, Да	Наименование белка
1	11,54	3,7	-	32 744	LytR family transcriptional regulator
2	10,80	2,3	6,99E+04	52 108	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 4
3	9,48	1,9	2,34E+04	84 548	Translation initiation factor IF-2
4	9,19	0,8	2,97E+04	135 077	DNA-directed RNA polymerase subunit beta
5	7,45	13,6	2,48E+04	10 762	Prepronociceptin (Fragment)
6	6,35	6,0	2,34E+04	30 018	Abortive infection protein
7	6,34	5,6	0,00E+00	29 241	Class I SAM-dependent methyltransferase
8	6,00	11,6	-	17 775	ArsR family transcriptional regulator
9	5,67	0,9	-	97 710	Toll-like receptor 5
10	5,65	4,5	-	22 953	Hyaluronan synthase 2 (Fragment)
11	4,95	5,0	5,08E+03	32 640	Geranyl transferase
12	4,93	10,3	-	46 268	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpX
13	4,66	2,2	1,18E+04	39 610	UDP-N-acetylglucosamine--N-acetylmuramyl-(pentapeptide) pyrophosphoryl-undecaprenol N-acetylglucosamine transferase
14	4,59	5,3	-	30 488	Stonin 2 (Fragment)
15	4,49	6,1	-	19 822	G protein-coupled receptor family C group 5 member C (Fragment)
16	4,21	5,5	7,96E+03	26 728	Cell division protein DivIVA
17	3,78	1,8	1,84E+04	40 830	FAD-binding oxidoreductase
18	3,36	1,5	1,07E+05	50 779	Methylenetetrahydrofolate--tRNA-(uracil-5-)-methyltransferase TrmFO
19	3,16	7,4	2,14E+04	21 117	Synaptotagmin IV (Fragment)
20	1,89	2,0	6,64E+04	38 816	S-adenosylmethionine:tRNA ribosyltransferase-isomerase

Известна роль ноцицептина в данных процессах с выраженным акцентом на вовлеченность системы NOP рецепторов в шизофрении [7]. Таким образом, дальнейшее изучение данных пептидов представляется интересным с точки зрения поиска эффективных терапевтических агентов в анальгезии, инициации процессов обучения и памяти, а также лечения злоупотребления опиоидами.

Выводы

В статье представлены данные протеомного анализа нативной ткани и лиофилизатов мускуса кабарги. Методом гель-размерной хроматографии получены данные по белковому профилированию и молекулярно-массовому распределению белков в экстрактах ПЖК в денатурирующих условиях.

С применением метода Брэдфорда установлено содержание общего водорастворимого белка в испытуемых экстрактах, выявлено влияние добавок детергента и условий экстрагирования на общий уровень белка в лиофилизатах. Максимальное содержание белка достигается в условиях с детергентами и составляет 10 масс. %.

Методом ВЭЖХ-МС ВР подвергнутых ферментативному гидролизу проб экстрактов идентифицированы обширные и представительные группы белков, характеризующие особенности широкого спектра биологической активности изучаемых объектов. Идентификация наиболее значимых (мажорных и минорных) белковых компонентов в экстрактах изучаемых объектов проведена в соответствии с ал-

горитмом поисковой программы Spectrum Mill MS Proteomics Workbench и белковой базой данных Uniprot.

В результате интерпретации белкового состава изучаемых экстрактов препуциальной железы кабарги сибирской все обнаруженные белки кластеризованы по молекулярным и биологическим функциям. Отображены связи идентифицированных белков с возможными механизмами биологического действия и мишенями, на которые могут оказывать воздействие белковые компоненты изучаемых объектов. По результатам исследования сделаны выводы о многокомпонентности белкового состава экстрактов ПЖК, предложены маркерные белковые компоненты в составе изучаемых экстрактов и указаны возможные взаимосвязи обнаруженных белков в составе экстрактов с биологическими эффектами. Особый интерес представляет группа белков и пептидов семейства препроноцицептина (PNOC), выступающего предшественником ряда эндогенных нейропептидов: ноцистатина, ноцицептина, орфанина FQ2 и других регуляторных пептидов. Перспективными нейропептидами с выраженным спектром описанной в литературе биологической активности являются ноцицептин-подобные пептиды, тропные к рецептору ORL1. Так, сам ноцицептин индуцирует гипералгезию, аллодинию, тревожность и депрессию. Предшественники и пептидо-миметики ноцицептина также имеют выраженные ноцицептин-индуцированные эффекты. Суммарно в экстракте ПЖК идентифицировано 66 аннотированных белков.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Каркищенко В.Н., Дуля М.С., Хвостов Д.В., Агелдинов Р.А. Анализ биологически активных соединений мускуса кабарги *Moschus moschiferus* методом газовой хроматографии с масс-селективным детектором // Биомедицина. — 2018. — № 1. — С. 19–39.
2. Ковалева С.В., Исаева И.В., Лутцева А.И., Аладышева Ж.И., Пихтарь А.В. Проблемы стандартизации гормональных препаратов пептидно-белковой природы // Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева). — 2005. — Т. 49. — № 1. — С. 135–145.
3. Лебедев А.Т., Артеменко К.А., Самгина Т.Ю. Основы масс-спектрометрии белков и пептидов. — М.: Техносфера, 2012. — 176 с.
4. Терентьев А.А., Молдогазиева Н.Т., Шайтан К.В. Динамическая протеомика в моделировании живой клетки. Белок-белковые взаимодействия // Успехи биологической химии. — 2009. — Т. 49. — С. 429–480.
5. Уйба В.В., Котенко К.В., Корчажкина Н.Б., Петрова Н.Б., Михайлова А.А. Применение мускуса кабарги в клинической практике: Метод. реком. — М., ФМБА России, 2013. — 18 с.
6. Ding H., Kiguchi N., Yasuda D. A bifunctional nociceptin and mu opioid receptor agonist is analgesic without opioid side effects in nonhuman primates // Science Translational Medicine. — 2018. — Vol. 10. — No. 456. — 11 p.
7. Khan M.S., Boileau I. A systematic review of the role of the nociceptin receptor system in stress, cognition, and reward: relevance to schizophrenia // Transl. Psychiatry. — 2018. — Vol. 8. — No. 1. — 38 p.
8. Koroleva S.V., Ashmarin I.P. Functional continuum of regulatory peptides (RPs): vector model of RP-effects representation // J. of Theoretical Biology. — 2002. — V. 216. — No. 3. — Pp. 257–271.
9. Mollereau C., Simons M. J., Soularue P., Liners F. Structure, tissue distribution, and chromosomal localization of the prepronociceptin gene // Proc. Natl Acad. Sci. USA. — 1996. — Vol. 93. — No. 16. — Pp. 8666–8670.
10. Oh S.R., Lee J.P., Chang S.Y., Shin D.H., Ahn K.S., Min B.S., Lee H.K. Androstane alkaloids from musk of *Moschus moschiferus* // Chem. Pharm. Bull. (Tokyo). — 2002. — Vol. 50. — No. 5. — Pp. 663–664.
11. Okuda-Ashitaka E., Minami T., Tachibana S., Yoshihara Y. Nocistatin, a peptide that blocks nociceptin action in pain transmission // Nature. — 1998. — Vol. 392. — No. 6673. — Pp. 286–289.
12. Sokolov V.E., Kagan M.Z., Vasilieva V.S., Prihodko V.I., Zinkevich E.P. Musk deer (*Moschus moschiferus*): Reinvestigation of main lipid components from preputial gland secretion // J. Chem. Ecol. — 1987. — Vol. 13. — No. 1. — Pp. 71–83.

REFERENCES

1. Karkischenko V.N., Dulya M.S., Khvostov DV, Ageldinov R.A. Analysis of the biologically active compounds of the musk deer *Moschus moschiferus* by gas chromatography with a mass-selective detector. Biomedicine. 2018. No. 1. Pp. 19–39 p. (In Russian).
2. Kovaleva S.V., Isaeva I.V., Luttseva A.I., Aladyshova Zh.I., Pikhtar A.V. Problems of standardization of hormone preparations of peptide — protein nature. Ros. khim. zh. (Zh. Ros. khim. ob-va im. D.I. Mendeleyeva) = Russian Chemical J. (J. of the Russian Chemical Society named after D.I. Mendeleyev). 2005. Vol. 49. No. 1. Pp. 135–145. (In Russian).
3. Lebedev A.T., Artemenko K.A., Samgina T.Yu. Fundamentals of mass-spectrometry of proteins and peptides. Moscow: Technosphere. 2012. 176 p. (In Russian).
4. Terentyev A.A., Moldogazieva N.T., Shaitan K.V. Dynamic proteomics in living cell modeling. Protein — protein interactions. Uspekhi biologicheskoy khimii = Advances in biological chemistry. 2009. Vol. 49. Pp. 429–480. (In Russian).
5. Ujba V.V., Kotenko K.V., Korchazhkina N.B., Petrova N.B., Mikhajlov A.A. The use of the musk deer in clinical practice: Methodical recommendations. Moscow, FMBA of Russia. 2013. 18 p. (In Russian).
6. Ding H., Kiguchi N., Yasuda D. A bifunctional nociceptin and mu opioid receptor agonist is analgesic nonhuman primates. Science Translational Medicine. 2018. Vol. 10. No. 456. 11 p.
7. Khan M.S., Boileau I. A systematic review of the nociceptin receptor in stress, cognition, and reward: relevance to schizophrenia. Transl Psychiatry. 2018. Vol. 8. No. 1. 38 p.
8. Koroleva S.V., Ashmarin I.P. Functional continuum of regulatory peptides (RPs): vector model of RP — effects representation. J. of Theoretical Biology. 2002. V. 216. No. 3. Pp. 257–271.
9. Mollereau C., Simons M. J., Soularue P., Liners F. Structure, tissue distribution, and chromosomal localization of the prepronociceptin gene. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1996. Vol. 93. No. 16. Pp. 8666–8670.
10. Oh S.R., Lee J.P., Chang S.Y., Shin D.H., Ahn K.S., Min B.S., Lee H.K. Androstane alkaloids from musk of *Moschus moschiferus*. Chem. Pharm. Bull. (Tokyo). 2002. Vol. 50. No. 5. Pp. 663–664.
11. Okuda-Ashitaka E., Minami T., Tachibana S., Yoshihara Y. Nocistatin, a peptide that block the action and transmission. Nature. 1998. Vol. 392. No. 6673. Pp. 286–289.
12. Sokolov V.E., Kagan M.Z., Vasilieva V.S., Prihodko V.I., Zinkevich E.P. Musk deer (*Moschus moschiferus*): Reinvestigation of lipid components from preputial gland secretion. J. Chem. Ecol. 1987. Vol. 13. No. 1. Pp. 71–83.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Каркищенко Владислав Николаевич, д.м.н., проф., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России»;
e-mail: scbmt@yandex.ru

Vladislav N. Karkischenko, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical Biological Agency of Russia;
e-mail: scbmt@yandex.ru

Дуля Максим Сергеевич*, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России»;
e-mail: mdulya@gmail.com

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

Хвостов Даниил Владиславович, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России»

Daniil V. Khvostov, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical Biological Agency of Russia

Агельдинов Руслан Андреевич, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России»

Ruslan A. Ageldinov, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical Biological Agency of Russia

Люблинский Станислав Львович, к.б.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России»

Stanislav L. Lyublinskiy, PhD Sci. (Biol.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical Biological Agency of Russia

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author



THE ROLE AND REGULATION OF HYPOXIA-INDUCIBLE TRANSCRIPTION FACTOR-1 AND SUCCINATE RECEPTOR-1 IN TYPE 2 DIABETES: A LINK TO VASCULAR COMPLICATIONS

Igor A. Pomytkin^{1,*}, Vladislav N. Karkischenko²

¹ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University
119991, Russian Federation, Moscow, Trubetskaya str., 8/2

² Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical Biological Agency of Russia
143442, Russian Federation, Moscow region, Krasnogorsk, Settlement Svetlye Gory, building 1

Type 2 diabetes is a major metabolic disorder that leads over time to serious complications. Tight glycemic control is considered to be an essential strategy for preventing diabetes-related complications. However, randomized clinical trials accrued over last decades have demonstrated no significant benefit of glycemic control in terms of decreasing micro- and macrovascular complications, except for a 15% reduction in the risk of nonfatal myocardial infarction. Emerging evidence suggests that vascular complications of diabetes correlate with a dysregulation of the angiogenic response governed by hypoxia-inducible transcription factor 1 (HIF-1) and succinate receptor 1 (SUCNR1). Type 2 diabetes affects HIF-1 activity at several levels, including HIF-1 α subunit transcription, mRNA translation into the HIF-1 α protein, degradation of the HIF-1 α protein and binding of the HIF-1 α protein to co-activators, which eventually results in a dysregulation of the adaptive angiogenic response to hypoxia. Both hyperglycemia and insulin resistance are involved in these impairments. Diabetes affects SUCNR1 signaling in a tissue-specific manner. A cross-talk between HIF-1 and SUCNR1 signaling explains, at least partially, paradoxical tissue-specific changes in the angiogenesis in diabetic microvascular complications, an excessive formation of blood vessels in the retina and a deficiency in small blood vessels in peripheral tissues, such as the skin. As a conclusion, targeting HIF-1 and SUCNR1 signaling seems to represent a novel promising approach for the prevention and treatment of diabetes-related vascular complications.

Keywords: Type 2 diabetes, hyperglycemia, insulin, hypoxia inducible factor 1 (HIF-1), succinate receptor 1 (SUCNR1), microvascular complications, macrovascular complications

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

Funding: The work was supported by the Russian Foundation for Basic Research, grant RFBR No. 18-015-00450.

For citation: Pomytkin I.A., Karkischenko V.N. The Role and Regulation of Hypoxia-Inducible Transcription Factor-1 and Succinate Receptor-1 in Type 2 Diabetes: a Link to Vascular Complications. *Biomedicine*. 2019;15(1):48–61. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-1-48-61>

Submitted 01.02.2019

Revised 11.02.2019

Published 10.03.2019

РОЛЬ И РЕГУЛЯЦИЯ ИНДУЦИРУЕМОГО ГИПОКСИЕЙ ФАКТОРА ТРАНСКРИПЦИИ-1 И СУКЦИНАТНОГО РЕЦЕПТОРА-1 ПРИ ДИАБЕТЕ ТИПА 2: СВЯЗЬ С СОСУДИСТЫМИ ОСЛОЖНЕНИЯМИ

И.А. Помыткин^{1,*}, В.Н. Каркищенко²

¹ ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет
им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет)
119991, Российская Федерация, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

² ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий
Федерального медико-биологического агентства России»
143442, Российская Федерация, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, владение 1

Диабет 2 типа является основным метаболическим заболеванием, которое со временем приводит к серьезным осложнениям. Жесткий контроль уровней глюкозы в крови считается важной мерой, позволяющей предотвратить осложнения диабета. Однако рандомизированные клинические испытания, проведенные за последние десятилетия, не выявили существенной пользы гликемического контроля для предотвращения микро- и макрососудистых осложнений диабета, за исключением снижения риска нефатального инфаркта миокарда на 15%. В то же время появляются данные, что существует корреляция между возникновением сосудистых осложнений сахарного диабета и нарушениями в регуляции ангиогенеза управляемой индуцируемым гипоксией фактором 1 (HIF-1) и сукцинатным рецептором 1 (SUCNR1). Диабет 2 типа влияет на активность HIF-1 на нескольких уровнях, включая транскрипцию субъединицы HIF-1 α , трансляцию мРНК в белок HIF-1 α , деградацию белка HIF-1 α и связывание белка HIF-1 α с коактиваторами, что в итоге приводит к нарушению адаптивного ангиогенного ответа на гипоксию. Гипергликемия и инсулиновая резистентность участвуют в этих нарушениях. Кроме того, диабет влияет на передачу сигналов сукцинатного рецептора 1 тканеспецифическим образом. Перекрестное взаимодействие между HIF-1 и SUCNR1 объясняет, по крайней мере частично, парадоксальные тканеспецифические изменения ангиогенеза при диабетических макрососудистых осложнениях, а именно чрезмерное образование кровеносных сосудов в сетчатке и дефицит мелких кровеносных сосудов в периферических тканях, таких как кожа. В заключение, терапевтическое воздействие на сигнальные системы HIF-1 и SUCNR1 может стать новым многообещающим подходом к профилактике и лечению сосудистых осложнений диабета 2 типа.

Ключевые слова: сахарный диабет 2 типа, гипергликемия, инсулин, индуцируемый гипоксией фактор 1 (HIF-1), сукцинатный рецептор 1 (SUCNR1), макрососудистые осложнения, макрососудистые осложнения

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: Работа выполнена при поддержке РФФИ: Грант РФФИ № 18-015-00450.

Для цитирования: Помыткин И.А., Каркищенко В.Н. Роль и регуляция индуцируемого гипоксией фактора транскрипции-1 и сукцинатного рецептора-1 при диабете типа 2: связь с сосудистыми осложнениями. *Биомедицина*. 2019;15(1):48–61. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-1-48-61>

Поступила 01.02.2019

Принята после доработки 11.02.2019

Опубликована 10.03.2019

Introduction

Diabetes mellitus (DM) is a major metabolic disorder with a global prevalence of 8.5% [1]. Type 1 diabetes and type 2 diabetes are the two chronic forms of DM, formerly known as insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetes mellitus, respectively. Type 2 diabetes accounts for approximately 90% of all diabetes cases and leads over time to serious complications. In 1993, the Diabetes Control and Complications Trial demonstrated the benefit of tight glycemic control for delaying the onset

and slowing the progression of diabetic retinopathy, nephropathy, and neuropathy, as well as for reducing the risk of macrovascular diseases in patients suffering from type 1 diabetes [2]. In 1998, the UK Prospective Diabetes Study Group showed that intensive blood-glucose control could substantially decrease the risk of microvascular complications, rather than macrovascular diseases, in patients with type 2 diabetes [3]. Practice guideline recommendations and clinical care standards have since focused on achieving tight glycemic control to prevent

complications in patients with both type 1 and type 2 diabetes. Contrary to the emerged consensus, findings from the ACCORD randomised trial (n=10,251) have demonstrated that intensive glucose lowering therapy does not reduce the risk of advanced measures of microvascular outcomes [4], nor does it reduce major cardiovascular events, while resulting in increased mortality [5]. Evidence from randomized clinical trials accrued over last decades and recent meta-analyses has led to scepticism about the value of tight glycemic control for the prevention of complications in patients with type 2 diabetes, since no significant benefit of such a therapy has been shown in terms of patient-important micro- and macrovascular outcomes, with the exception of a 15% reduction in the risk of nonfatal myocardial infarction [6]. These findings spur the need to explore other factors beyond glycemic control in order to discover new therapeutic approaches for the prevention of vascular complications caused by type 2 diabetes.

An impaired adaptive response to hypoxia is a key pathological characteristic of type 2 diabetes. In general, the adaptive response is mediated by signaling of two oxygen sensors, i.e. hypoxia-inducible transcription factors (HIFs) and succinate receptor 1 (SUCNR1). Growing evidence suggests that type 2 diabetes results in dysregulation of HIFs and SUCNR1 signaling. It may contribute to vascular complications, given that the angiogenic response is an essential part of HIFs and SUCNR1 action. This review summarizes the role and regulation of hypoxia-inducible transcription factors and SUCNR1 in type 2 diabetes, as well as the vascular complications thereof.

Hypoxia-inducible transcription factors

Hypoxia-inducible transcription factors were originally discovered as oxygen sensors that play key roles in the transcriptional response to hypoxia [7, 8]. HIFs are heterodimeric proteins consisting of a unique O₂-regulated alpha subunit (HIF-1 α , HIF-2 α or

HIF-3 α) and an oxygen-independent HIF-1 β subunit. HIF-1 α is ubiquitously expressed in the body, whereas expression of a structurally similar HIF-2 α is restricted to certain cell types, mainly endothelial and epithelial cells, as well as neurons [9, 10]. There is a consensus that HIF-1 and HIF-2 are activators of the transcriptional response to hypoxia, while HIF-3 is generally viewed as a negative regulator of HIF-1/HIF-2 activity [11]. The most knowledge about the roles of HIFs in adaption to hypoxia was obtained from studies on HIF-1. Upon activation, HIF-1 directly regulates the expression of more than 1,000 human genes in a cell type-specific manner [12, 13]. In particular, HIF-1 activates expression of genes encoding glucose transporters 1 (GLUT1) and 3 (GLUT3) and virtually all glycolytic enzymes to provide a metabolic shift from oxidative phosphorylation towards glycolysis. In addition, HIF-1 upregulates expression of a set of angiogenic factors, mainly vascular endothelium growth factor (VEGF), as well as receptors and signaling molecules involved in angiogenesis, vascular remodeling and vascular response (Table 1). Therefore, HIF-1 plays a key role in vascularization of body tissues, and its dysregulation may lead to vascular complications in type 2 diabetes.

Regulation of HIF-1 activity

HIF-1 activity is controlled by a steady-state level of the HIF-1 α protein through a tight regulation of the balance between its synthesis and degradation. Insulin stimulates HIF-1 α synthesis via activation of the canonical phosphatidylinositol-3-kinase PI3K/AKT/mTOR signaling pathway that increases the rate of HIF-1 α mRNA translation into the HIF-1 α protein [25, 26, 27]. Certain cytokines and growth factors, including insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and 2 (IGF-2) [28, 29], increase HIF-1 α synthesis in a manner similar to that for insulin [30].

HIF-1 α degradation is a key process in the regulation of the cellular response to hypoxia.

Table 1. Examples of HIF-1 target genes encoding angiogenic factors

Таблица 1. Примеры генов-мишеней HIF-1, кодирующих факторы ангиогенеза

Encoding protein	Gene	Refs
Adrenomedullin	ADM	[14][15]
Angiopoietin 1	ANGPT1	[16] [17]
Angiopoietin 2	ANGPT2	[17] [18]
Apelin	APLN	[19]
Endothelin 1	EDN1	[20] [21]
Placental growth factor	PGF	[17]
Platelet-derived growth factor B	PDGFB	[17]
Vascular endothelial growth factor	VEGF	[22]
VEGF receptor 1	FLT1	[23] [24]

Table 2. IC₅₀ values for inhibition of 4-prolyl hydroxylases with succinate and fumarate

Таблица 2. Значения IC₅₀ для ингибирования 4-пролилгидроксилаз с сукцинатом и фумаратом

4-Prolyl hydroxylase	IC ₅₀ , μM		Km, μM
	Succinate [39]	Fumarate [39]	2-Oxoglutarate [32]
PHD1	830	120	60
PHD2	510	80	60
PHD3	570	60	55

Under normoxia, hydroxylation of HIF-1α at one or two proline residues with 4-prolyl hydroxylases (PHDs) triggers ubiquitination and a rapid proteasomal degradation of the HIF-1α protein. The degradation is rapid, with a half-life of HIF-1α being less than 5 min at 21% O₂ in well-oxygenated cells [31]. 4-Prolyl hydroxylases act as oxygen sensors, since their activity directly depend on oxygen concentrations. All three isoforms — PHD1, PHD2 and PHD3 — utilize O₂ and 2-oxoglutarate, the metabolite of the citric acid cycle, as substrates with the Km values of 230-250 μM and 55-60 μM, respectively [32]. Since the Km values for O₂ are slightly above the atmospheric concentration of O₂ (about 200 μM), even a small shift to hypoxia decreases the activity of PHDs and slows the rate of HIF-1α degradation. Accumulated HIF-1α dimerizes with HIF-1β, binds to the hypoxia response element (HRE), recruits the transcriptional co-activators p300/CBP and activates the transcription of target genes [33, 15]. In parallel, hypoxia unlocks the HIF-1α/p300 interaction via downregulating

HIF-1α protein hydroxylation at the asparagine residue with a factor inhibiting HIF-1 (FIH-1) [34, 35].

Among the three isoforms of 4-prolyl hydroxylases, PHD2 is the major negative regulator for HIF-1α and the most abundant isoform in normoxic cells [36]. PHD2 is the major negative regulator for VEGF [37] and the most potent inhibitor of vascular growth in tissues [38]. Therefore, PHD2 is considered to be a promising target for therapeutic interventions, and several PHD2 antagonists are currently under development as drug candidates.

Succinate and fumarate — intermediates of the citric acid cycle — are metabolic inhibitors of 4-prolyl hydroxylases [39]. The half-maximal inhibitory concentrations (IC₅₀) values for succinate- and fumarate-induced inhibition of 4-prolyl hydroxylases in comparison with Km values for 2-oxoglutarate are presented in Table 2.

Fumarate is a competitive inhibitor of 4-prolyl hydroxylases due to its structural similarity with 2-oxoglutarate. The fumarate IC₅₀ value

for PHD2 inhibition is close to K_m values for 2-oxoglutarate, suggesting that fumarate can prevent a PHD2-induced degradation of the HIF-1 α protein and may play a role in the regulation of HIF-1 activity under physiologically relevant conditions.

Succinate is characterized by a much weaker inhibiting activity compared to fumarate, with its IC_{50} values of $> 500 \mu M$ being distinct from its range of physiological concentrations. For the reference, succinate levels in human plasma vary from 1 to 9 μM at rest and increase up to 125 μM under hypoxic conditions (treadmill running or breath-hold diving) [40, 41]. Therefore, succinate plays a role in the inhibition of HIF-1 α degradation only in cases of severe ischemia, when succinate levels can rise up to millimolar values [42].

Succinate receptor 1

Succinate receptor 1 (SUCNR1) is an alternative oxygen sensor that triggers an angiogenic response to hypoxia. SUCNR1 is a member of the rhodopsin-like G protein-coupled receptor family (GPCRs) [43]. It was discovered in 2001 as a GPR91 receptor and was initially viewed as a new purinergic receptor due to its similarity with such molecules [44]. Later, the receptor was established to be highly specific towards succinate [45], subsequently being re-named as succinate receptor 1. Half-maximum potency (EC_{50}) values for the succinate-induced SUCNR1 activation vary within the 17-56 μM range, depending on the type of cells transfected with human SUCNR1 and assay methods [45, 46, 47]. The EC_{50} value for succinate in the SUCNR1-mediated calcium mobilization is at least by one-order lower compared to that for such intermediates of the citric acid cycle as oxaloacetate (171 μM), L-malate (207 μM), 2-oxoglutarate (7.3 mM) and fumarate (>1 mM) [45, 48]. Upon binding, succinate triggers the activation of the SUCNR1/MAPK/ERK signaling pathway, calcium mobilization and the G_i protein-mediated inhibition of cAMP production [43].

Under hypoxia, when succinate concentrations rise, the SUCNR1 receptor triggers angiogenesis in a way alternative to HIF-1. The succinate/SUCNR1 signaling pathway upregulates the expression of VEGF, angiopoietins 1 and 2, as well as other angiogenic genes in a tissue-specific manner, which results in re-vascularization of hypoxic tissues [49]. Therefore, dysregulation of SUCNR1 signaling may lead to vascular complications of type 2 diabetes.

SUCNR1 expression in murine tissues was originally considered to be limited to the kidney, liver, spleen and small intestine [45]. However, later studies have shown SUCNR1 to be ubiquitously expressed, although its amount varying greatly between types of cells. The highest expression of SUCNR1 mRNA and protein was observed in the peripheral white adipose tissue and the kidney, followed by organs of various functional systems including the respiratory, urinary, digestive, reproductive, central and peripheral nervous systems [50, 51]. At the organ level, SUCNR1 expression is cell-specific. In the kidney, SUCNR1 localizes to the renal vascular lumen, in particular the afferent arteriole and the glomerular vasculature, as well as in the luminal membrane of multiple segments of the renal tubules [52, 46]. In the liver, SUCNR1 is exclusively expressed in quiescent hepatic stellate cells [53]. In the heart, SUCNR1 expression is low [51], while some studies have demonstrated that SUCNR1 is expressed in the ventricular cardiomyocytes, mainly in the sarcolemma membrane and T-tubules [54, 55, 56]. In the retina, SUCNR1 is predominantly expressed in the cell bodies of the retinal ganglion cell layer [57]. In the brain, SUCNR1 is expressed in cortical neurons, astrocytes [49], and neural stem cells [58]. SUCNR1 plays a key role in haematopoiesis. Stimulation of SUCNR1 on hematopoietic progenitor cells (HPC) of the bone marrow induces the proliferation of erythroid and megakaryocyte progenitor cells [59]. SUCNR1 is expressed in human plate-

lets [60], dendritic cells, [61], T lymphocytes (CD4+ and CD8+) and B (CD19+) cells [62].

Diabetes affects an adaptive angiogenic response to hypoxia

VEGF is the major angiogenic factor that mediates the HIF-1- and SUCNR1-induced adaptive response to hypoxia. VEGF induces vascular permeability and drives the proliferation and migration of vascular endothelial cells [63]. In 2002, Chou et al discovered that diabetes affects the VEGF-mediated angiogenesis in microvascular and cardiac tissues in an opposite manner [64]. The expression of mRNA and protein for VEGF and its receptors in diabetic rats was as twice as low in the myocardium, while being as twice as high in the retina and glomeruli [64]. The differential regulation function of VEGF has since been shown for other diabetic tissues.

1. Cardiovascular complications of diabetes

Cardiovascular complications of diabetes mellitus are the leading causes of diabetes-related morbidity and mortality [65]. Growing evidence suggests that coronary vessel anomalies correlate with a reduced HIF-1 and VEGF signaling in the diabetic heart. In the coronary circulation, impaired collateral vessel formation has been demonstrated in the hearts of patients with diabetes [66, 67, 68]. A two-fold decrease in the VEGF mRNA and VEGF receptor 2 (VEGFR-2) mRNA levels was observed in cardiac samples from patients with type 1 and 2 diabetes compared to non-diabetic donors [64]. Ventricular biopsy specimens from type 2 diabetic patients showed a decrease in the HIF-1 α and VEGF levels in comparison with a non-diabetic control group [69]. Animal experiments have demonstrated that the HIF-1 α reduction in ventricular cardiomyocytes leads to a significant reduction of vessel counts in the myocardium compared with controls [70], and that such an altered HIF-1 signaling coincides with the left and right coronary artery anomalies [71]. Collectively, these findings indicate that a reduction

in HIF-1/VEGF signaling in the diabetic heart correlates with cardiovascular complications and seems to underlie a diminished adaptive response to hypoxia. The mechanisms behind the HIF-1 α cardiac reduction in diabetes have been found to be of metabolic origin and driven by increased fatty acids [72] and hyperglycemia [73].

2. Diabetic nephropathy

Diabetic nephropathy (DN) is a leading cause of end-stage renal disease that accounts for the increased mortality rate in type 1 and type 2 diabetes [74, 75]. Hypoxia represents an early event in the development and progression of DN. HIF-1 has been shown to mediate the metabolic responses to renal hypoxia [76]. Renal expression of the HIF-1 target genes, VEGF and its receptors was up-regulated in experimental animals and patients with type 1 and type 2 diabetes, especially early in the course of diabetes [77]. Hyperglycemia upregulates HIF-1 α transcription in the glomeruli of diabetic model mice through a glucose-responsive carbohydrate-responsive element-binding protein (ChREBP) [78, 79]. It still remains controversial whether HIF-1 activation exerts a beneficial or harmful role in the development of diabetic nephropathy [80]. Evidence suggests that activation of HIF-1 may even prevent diabetic nephropathy [81, 82], whereas impairment of HIF-1 signaling accelerates progression of kidney disease [83]. A short, but not prolonged, therapeutic activation of HIF-1 has been proposed as a promising protective approach to the treatment of kidney disease in patients with diabetes [76].

3. Diabetic retinopathy

Diabetic retinopathy remains a leading cause of blindness in persons with diabetes [84]. VEGF upregulation has been considered to be a major cause of retinal neovascularization and vascular leakage that lead to the progression of proliferative diabetic retinopathy (PDR) and diabetic macular edema (DME)

[85, 86]. The reduction of VEGF in diabetic retina is believed to be an effective therapy against DME and PDR. In line with this, multiple anti-VEGF drugs are widely used as the first line of treatment [87]. The increase of HIF-1 α correlates temporally and spatially with increased retinal VEGF levels in hypoxic retina [88]. However, SUCNR1-dependent, rather than HIF-1 dependent, VEGF production is considered to be the major cause of proliferative diabetic retinopathy. SUCNR1 is predominately expressed in retinal ganglion cells, with its activation triggering the release of pro-angiogenic factors, such as VEGF and angiopoietins [57]. Succinate levels rise regionally in retina in response to hyperglycemia. Mean succinate concentrations in the vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy were 1.7-fold higher than those in non-diabetic control groups [89]. A local rise in retinal succinate triggers VEGF expression through the SUCNR1/ERK1,2/EBP β (c-Fos) and ERK1/2-COX-2/PGE2 signaling pathways [90, 91]. The inhibition of retinal SUCNR1 signaling prevents a high glucose-induced VEGF protein production [90], identifying SUCNR1 as a promising target in the treatment of proliferative diabetic retinopathy.

4. Diabetic foot ulceration

Diabetic foot ulceration (DFU) is a chronic major complication of diabetes mellitus characterized by impaired wound healing that frequently leads to the lower limb amputations [92]. Hypoxia is an essential feature of a wound, thus being a critical stimulus for normal wound healing [93]. Transcutaneous oxygen tension has been shown to be predictive of ulcer healing in patients with diabetes and chronic foot ulcers [94]. Emerging evidence suggests that impaired cellular response to hypoxia is a causative factor for delayed wound healing in diabetic patients. Biopsy specimens from patients with DFU demonstrated lower HIF-1 α protein levels in com-

parison with those from patients with chronic venous ulcers [95]. Fibroblasts from the dermis of diabetic db/db mice exhibited a seven-fold decrease in the basal VEGF production ($P < 0.001$) compared to wild-type fibroblasts, thus having lost responsiveness to hypoxia [96]. Markedly lower levels of VEGF expression in the skin were found in streptozotocin (STZ)-induced mice and db/db mice following cutaneous ischemia compared to wild-type mice [97]. Dermal fibroblasts from patients with type 2 diabetes demonstrated a two-fold decrease in the production of VEGF protein in response to hypoxia (0.5% O₂) compared to age-matched nondiabetic control, which effect was linked to hyperglycemia [97, 98]. Hyperglycemia is believed to be central to the repression of HIF-1 signaling in diabetic wounds. In vitro studies in primary human dermal fibroblasts and endothelial cells, as well as in db/db mouse primary fibroblasts [99], have demonstrated hyperglycemia to destabilize HIF-1 α protein and down-regulate the transcription of several HIF-1 target genes essential for wound healing, including heat shock protein 90, VEGF-A, VEGF-R1, stromal cell-derived factor (SDF)-1 α and stromal cell factor (SCF) [99]. Non-selective inhibitors of 4-prolyl hydroxylases counteract the hyperglycemia-induced repressive effect on HIF-1 functions and improve wound healing in db/db mice [99]. PHD2 silencing improves diabetic murine wound closure [100]. The molecular basis for the repression of HIF-1 signaling under hyperglycemia is still debated. The glyoxalase 1 (GLO1) substrate methylglyoxal was shown to modify HIF-1 α and co-activator p300 under hyperglycemia, hampering its interaction critical for the activation of transcription of HIF-1 target genes [101, 97].

Mechanisms underlying diabetes-induced impairment of the adaptive response to hypoxia

The aforementioned data demonstrate the dysregulation of HIF-1 and SUCNR1 signal-

ing to correlate with both an impaired adaptive response to hypoxia and vascular complications in type 2 diabetes. Reduced HIF-1 levels are a major factor in vascular complications in type 2 diabetes, with the exception of proliferative diabetic retinopathy caused by SUCNR1 overactivity.

Type 2 diabetes affects HIF-1 signaling at least at five regulatory points (Figure).

Hyperglycemia upregulates HIF-1 α transcription through the glucose-responsive car-

bohydrate- responsive element-binding protein (ChREBP) [78, 79], but destabilizes the HIF-1 α protein under hypoxia [95, 99]. This destabilizing effect is mediated by methylglyoxal, a highly reactive metabolite of spontaneous decomposition of triose phosphate intermediates in glycolysis, which levels increase under hyperglycemia [73]. Additionally, methylglyoxal modifies the arginine and lysine residues in proteins involved in HIF-1 signaling, such as HIF-1 α and co-activator

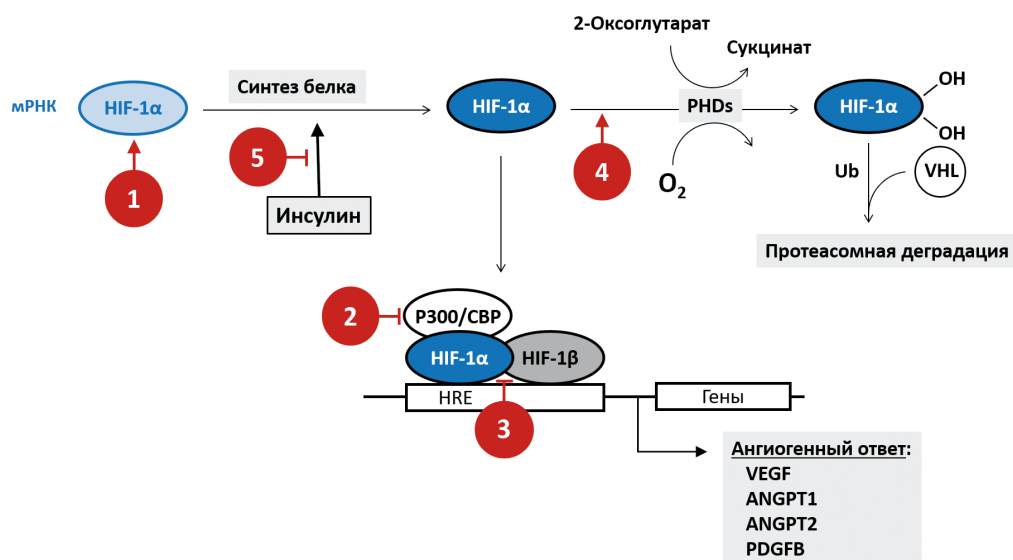


Fig. Type 2 diabetes affects the HIF-1-mediated angiogenic response to hypoxia.

Under hypoxic conditions, the HIF-1 α protein accumulates, dimerizes with HIF-1 β , recruits co-activators p300/CBP and binds to hypoxia response elements (HREs) to activate the transcription of target genes encoding angiogenic factors. Type 2 diabetes affects the HIF-1-mediated angiogenic response to hypoxia at least at five levels. Red circles indicate regulatory points at which HIF-1 signaling is affected by type 2 diabetes. ① — Hyperglycemia upregulates transcription of HIF-1 α mRNA; ②, ③ — Methylglyoxal/hyperglycemia downregulates transcription of HIF-1 target genes, preventing HIF-1 α /HIF-1 β and HIF-1 α /p300 interactions within the transcription complex; ④ — Methylglyoxal/hyperglycemia downregulates HIF-1 α accumulation, promoting degradation of HIF-1 α protein; ⑤ — Insulin resistance presumably downregulates HIF-1 α protein synthesis, affecting the insulin-stimulated translation of HIF-1 α mRNA to protein.

Рис. Диабет 2 типа влияет на ангиогенный ответ на гипоксию опосредованный HIF-1.

В условиях гипоксии белок HIF-1 α накапливается, образует димер с HIF-1 β , рекрутирует ко-активаторы p300 / CBP и связывается с HIF-чувствительными элементами в промоторах (HRE) и, так, активирует транскрипцию генов-мишеней, кодирующих факторы ангиогенеза. Диабет 2 типа влияет на HIF-1-опосредованный ангиогенный ответ, по меньшей мере, на пяти уровнях. Красным отмечены регуляторные точки, в которых диабет 2 типа влияет на передачу сигналов HIF-1. ① — Гипергликемия активирует транскрипцию мРНК HIF-1 α субъединицы. ②, ③ — Метилглиоксаль / гипергликемия подавляют транскрипцию генов-мишеней HIF-1, предотвращая взаимодействия между HIF-1 α / HIF-1 β и HIF-1 α / p300 в транскрипционном комплексе. ④ — Метилглиоксаль / гипергликемия способствуют деградации белка HIF-1 α и, так, подавляют накопление HIF-1 α при гипоксии. ⑤ — Инсулиновая резистентность подавляет синтез белка HIF-1 α , влияя на стимулированный инсулином процесс трансляции мРНК HIF-1 α .

p300, which results in hampering interactions between HIF-1 α , HIF-1 β and p300 within the transcription complex and inhibiting activation of the transcription of HIF-1 target genes [101, 97].

Insulin resistance is a hallmark of type 2 diabetes. The Consensus Development Conference on Insulin Resistance has defined insulin resistance as an impaired biological response to insulin, which should not be confined solely to glucose metabolism parameters, but should apply to all biological actions of insulin [102]. Previous studies have demonstrated that insulin directly upregulates HIF-1 α protein synthesis, leading to HIF-1 α accumulation even under normoxic conditions [25, 26, 27]. However, the effect of insulin resistance on HIF-1 α protein synthesis in type 2 diabetes is yet to be revealed. It seems likely that insulin resistance can downregulate HIF-1 α protein synthesis. In this context, insulin resistance and hyperglycemia, acting as pathologic factors in type 2 diabetes, will both lead to a reduction in HIF-1 α protein, although by two different mechanisms. Hyperglycemia affects HIF-1 α degradation, while insulin resistance is likely affect HIF-1 α protein synthesis. The undervalued role of insulin resistance in HIF-1-mediated angiogenic response seems to explain why tight glycemic control alone is not sufficient for the prevention of vascular complications in type 2 diabetes.

Succinate deficiency caused by a switch to free fatty acid metabolism has been shown to be an alternative factor behind the HIF-1 α reduction in diabetic hearts, in view that succinate can promote HIF-1 α accumulation through inhibition of regulatory 4-prolyl hydroxylases (Table 2) [72].

Conclusion and prospects

In general, a tissue-specific dysregulation of the HIF-1-mediated angiogenic response to hypoxia correlates with micro- and macrovascular complications of type 2 diabetes. The retina-specific overactivation of succinate/SUCNR1 signaling explains, at least partially, paradoxical tissue-specific changes in the angiogenesis in diabetic microvascular complications, an excessive formation of premature blood vessels in the retina and a deficiency in the formation of small blood vessels in peripheral tissues, such as the skin.

Although current research is mainly focused on the role of hyperglycemia in the vascular complications of diabetes, hyperglycemia seems to be not the sole factor causal to dysregulation of HIF-1 signaling in type 2 diabetes. There is strong evidence that insulin directly upregulates HIF-1 α protein synthesis. Therefore, local insulin resistance might downregulate the HIF-1-mediated response to hypoxia, thus contributing to the development of vascular complications in type 2 diabetes. This seems to explain, at least partially, recent findings that have shown no significant benefit of tight glucose control in terms of patient-important micro- and macrovascular outcomes, with the exception of a 15% reduction in the relative risk of nonfatal myocardial infarction [6]. Future research should aim at verifying the hypothesis about the role of insulin resistance in the HIF-1 related angiogenic response in type 2 diabetes.

In addition, the improvement of insulin receptor signaling at target hypoxic regions seems to be a novel promising approach to the treatment of vascular complications caused by type 2 diabetes.

REFERENCES

1. World Health Organization. Global report on diabetes. Geneva: 2016. <https://www.who.int/diabetes/global-report/en/> (accessed Jan 15, 2019).
2. Diabetes Control and Complications Trial Research Group, Nathan D.M., Genuth S., Lachin J., Cleary P., Crofford O., Davis M., Rand L., Siebert C. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 1993 Sep 30;329(14):977–86.

3. [No authors listed] Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet*. 1998 Sep 12;352(9131):837–53.
4. Ismail-Beigi F., Craven T., Banerji M.A., Basile J., Calles J., Cohen R.M., Cuddihy R., Cushman W.C., Genuth S., Grimm R.H.Jr., Hamilton B.P., Hoogwerf B., Karl D., Katz L., Krikorian A., O'Connor P., Pop-Busui R., Schubart U., Simmons D., Taylor H., Thomas A., Weiss D., Hramiak I.; ACCORD trial group. Effect of intensive treatment of hyperglycaemia on microvascular outcomes in type 2 diabetes: an analysis of the ACCORD randomised trial. *Lancet*. 2010 Aug 7;376(9739):419–30.
5. Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes Study Group, Gerstein H.C., Miller M.E., Byington R.P., Goff D.C. Jr., Bigger J.T., Buse J.B., Cushman W.C., Genuth S., Ismail-Beigi F., Grimm R.H. Jr., Probstfield J.L., Simons-Morton D.G., Friedewald W.T. Effects of intensive glucose lowering in type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med*. 2008 Jun 12;358(24):2545–59.
6. Rodríguez-Gutiérrez R., Montori V.M. Glycemic Control for Patients With Type 2 Diabetes Mellitus: Our Evolving Faith in the Face of Evidence. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes*. 2016 Sep;9(5):504–12.
7. Semenza G.L., Nejfelt M.K., Chi S.M., Antonarakis S.E. Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991;88:5680–4.
8. Samanta D., Semenza G.L. Maintenance of redox homeostasis by hypoxia-inducible factors. *Redox Biol*. 2017 Oct;13:331–5.
9. Flamme I., Fröhlich T., von Reutern M., Kappel A., Damert A., Risau W. HRF, a putative basic helix-loop-helix-PAS-domain transcription factor is closely related to hypoxia-inducible factor-1 alpha and developmentally expressed in blood vessels. *Mech Dev*. 1997 Apr;63(1):51–60.
10. Wiesener M.S., Turley H., Allen W.E., Willam C., Eckardt K.U., Talks K.L., Wood S.M., Gatter K.C., Harris A.L., Pugh C.W., Ratcliffe P.J., Maxwell P.H. Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1alpha. *Blood*. 1998 Oct 1;92(7):2260–8.
11. Ravenna L., Salvatori L., Russo M.A. HIF3α: the little we know. *FEBS J*. 2016 Mar;283(6):993–1003.
12. Semenza G.L. Hypoxia-inducible factor 1 and cardiovascular disease. *Annu Rev Physiol*. 2014;76:39–56.
13. Hellwig-Bürgel T., Stiehl D.P., Wagner A.E., Metzen E., Jelkmann W. Review: hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1): a novel transcription factor in immune reactions. *J Interferon Cytokine Res*. 2005 Jun;25(6):297–310.
14. Cormier-Regard S., Nguyen S.V., Claycomb W.C. Adrenomedullin gene expression is developmentally regulated and induced by hypoxia in rat ventricular cardiac myocytes. *J. Biol. Chem*. 1998 Jul 10;273(28):17787–92.
15. Manalo D.J., Rowan A., Lavoie T., Natarajan L., Kelly B.D., Ye S.Q., Garcia J.G., Semenza G.L. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood*. 2005 Jan 15;105(2):659–69.
16. Bosch-Marce M., Okuyama H., Wesley J.B., Sarkar K., Kimura H., Liu Y.V., Zhang H., Strazza M., Rey S., Savino L., Zhou Y.F., McDonald K.R., Na Y., Vandersiver S., Rabi A., Shaked Y., Kerbel R., Lavallee T., Semenza G.L. Effects of aging and hypoxia-inducible factor-1 activity on angiogenic cell mobilization and recovery of perfusion after limb ischemia. *Circ Res*. 2007 Dec 7;101(12):1310–8.
17. Kelly B.D., Hackett S.F., Hirota K., Oshima Y., Cai Z., Berg-Dixon S., Rowan A., Yan Z., Campochiaro P.A., Semenza G.L. Cell type-specific regulation of angiogenic growth factor gene expression and induction of angiogenesis in nonischemic tissue by a constitutively active form of hypoxia-inducible factor 1. *Circ Res*. 2003 Nov 28;93(11):1074–81.
18. Simon M.P., Tournaire R., Pouyssegur J. The angiopoietin-2 gene of endothelial cells is up-regulated in hypoxia by a HIF binding site located in its first intron and by the central factors GATA-2 and Ets-1. *J Cell Physiol*. 2008 Dec;217(3):809–18.
19. Eyries M., Siegfried G., Ciumas M., Montagne K., Agrapart M., Lebrin F., Soubrier F. Hypoxia-induced apelin expression regulates endothelial cell proliferation and regenerative angiogenesis. *Circ Res*. 2008 Aug 15;103(4):432–40.
20. Hu J., Discher D.J., Bishopric N.H., Webster K.A. Hypoxia regulates expression of the endothelin-1 gene through a proximal hypoxia-inducible factor-1 binding site on the antisense strand. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 Apr 28;245(3):894–9.
21. Camenisch G., Stroka D.M., Gassmann M., Wenger R.H. Attenuation of HIF-1 DNA-binding activity limits hypoxia-inducible endothelin-1 expression. *Pflügers Arch*. 2001 Nov;443(2):240–9.
22. Forsythe J.A., Jiang B.H., Iyer N.V., Agani F., Leung S.W., Koos R.D., Semenza G.L. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol*. 1996 Sep;16(9):4604–13.
23. Gerber H.P., Condorelli F., Park J., Ferrara N. Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. *J. Biol. Chem*. 1997 Sep 19;272(38):23659–67.
24. Okuyama H., Krishnamachary B., Zhou Y.F., Nagasawa H., Bosch-Marce M., Semenza G.L. Expression of vascular endothelial growth factor receptor 1 in bone marrow-derived mesenchymal cells is dependent on hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem*. 2006 Jun 2;281(22):15554–63.
25. Zelzer E., Levy Y., Kahana C., Shilo B.Z., Rubinstein M., Cohen B. Insulin induces transcription of target genes through the hypoxia-inducible factor HIF-1alpha/ARNT. *EMBO J*. 1998 Sep 1;17(17):5085–94.

26. Treins C., Giorgetti-Peraldi S., Murdaca J., Semenza G.L., Van Obberghen E. Insulin stimulates hypoxia-inducible factor 1 through a phosphatidylinositol 3-kinase/target of rapamycin-dependent signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 2002 Aug 2;277(31):27975–81.
27. Stiehl D.P., Jelkmann W., Wenger R.H., Hellwig-Bürgel T. Normoxic induction of the hypoxia-inducible factor 1 α by insulin and interleukin-1 β involves the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *FEBS Lett.* 2002 Feb 13;512(1–3):157–62.
28. Feldser D., Agani F., Iyer N.V., Pak B., Ferreira G., Semenza G.L. Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1 α and insulin-like growth factor 2. *Cancer Res.* 1999 Aug 15;59(16):3915–8.
29. Jiang B.H., Jiang G., Zheng J.Z., Lu Z., Hunter T., Vogt P.K. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling controls levels of hypoxia-inducible factor 1. *Cell Growth Differ.* 2001 Jul;12(7):363–9.
30. Masoud G.N., Li W. HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharm Sin B.* 2015 Sep;5(5):378–89.
31. Salceda S., Caro J. Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J. Biol. Chem.* 1997 Sep 5;272(36):22642–7.
32. Hirsilä M., Koivunen P., Gunzler V., Kivirikko K.I., Myllyharju J. 2003. Characterization of the human prolyl 4-hydroxylases that modify the hypoxia-inducible factor. *J. Biol. Chem.* 278:30772–80.
33. Poellinger L., Johnson R.S. HIF-1 and hypoxic response: the plot thickens. *Curr Opin Genet Dev.* 2004 Feb;14(1):81–5.
34. Mahon P.C., Hirota K., Semenza G.L. FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1 α and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev* (2001) 15:2675–86.
35. Lando D., Peet D.J., Whelan D.A., Gorman J.J., Whitelaw M.L. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science* (2002) 295:858–61.
36. Appelhoff R.J., Tian Y.M., Raval R.R., Turley H., Harris A.L., Pugh C.W., Ratcliffe P.J., Gleadle J.M. Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. *J. Biol. Chem.* 2004 Sep 10;279(37):38458–65.
37. Wu S., Nishiyama N., Kano M.R., Morishita Y., Miyazono K., Itaka K., Chung U.I., Kataoka K. Enhancement of angiogenesis through stabilization of hypoxia-inducible factor-1 by silencing prolyl hydroxylase domain-2 gene. *Mol Ther.* 2008 Jul;16(7):1227–34.
38. Takeda K., Cowan A., Fong G.H. Essential role for prolyl hydroxylase domain protein 2 in oxygen homeostasis of the adult vascular system. *Circulation.* 2007 Aug 14;116(7):774–81.
39. Koivunen P., Hirsilä M., Remes A.M., Hassinen I.E., Kivirikko K.I., Myllyharju J. Inhibition of hypoxia-inducible factor (HIF) hydroxylases by citric acid cycle intermediates: possible links between cell metabolism and stabilization of HIF. *J. Biol. Chem.* 2007 Feb 16;282(7):4524–32.
40. Komaromy-Hiller G., Sundquist P.D., Jacobsen L.J., Nuttall K.L. Serum succinate by capillary zone electrophoresis: marker candidate for hypoxia. *Ann Clin Lab Sci.* 1997 Mar–Apr;27(2):163–8.
41. Hochachka P.W., Dressendorfer R.H. Succinate accumulation in man during exercise. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* 1976 Sep 23;35(4):235–42.
42. Chouchani E.T., Pell V.R., Gaude E., Aksentijević D., Sundier S.Y., Robb E.L., Logan A., Nadtochiy S.M., Ord E.N.J., Smith A.C., Eyassu F., Shirley R., Hu C.H., Dare A.J., James A.M., Rogatti S., Hartley R.C., Eaton S., Costa A.S.H., Brookes P.S., Davidson S.M., Duchon M.R., Saeb-Parsy K., Shattock M.J., Robinson A.J., Work L.M., Frezza C., Krieg T., Murphy M.P. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature.* 2014 Nov 20;515(7527):431–5.
43. Gilissen J., Jouret F., Pirotte B., Hanson J. Insight into SUCNR1 (GPR91) structure and function. *Pharmacol Ther.* 2016 Mar;159:56–65.
44. Wittenberger T., Schaller H.C., Hellebrand S. An expressed sequence tag (EST) data mining strategy succeeding in the discovery of new G-protein coupled receptors. *J Mol Biol.* 2001 Mar 30;307(3):799–813.
45. He W., Miao F.J., Lin D.C., Schwandner R.T., Wang Z., Gao J., Chen J.L., Tian H., Ling L. Citric acid cycle intermediates as ligands for orphan G-protein-coupled receptors. *Nature.* 2004 May 13;429(6988):188–93.
46. Robben J.H., Fenton R.A., Vargas S.L., Schweer H., Peti-Peterdi J., Deen P.M., Milligan G. Localization of the succinate receptor in the distal nephron and its signaling in polarized MDCK cells. *Kidney Int.* 2009 Dec;76(12):1258–67.
47. Sundström L., Greasley P.J., Engberg S., Walander M., Ryberg E. Succinate receptor GPR91, a G α (i) coupled receptor that increases intracellular calcium concentrations through PLC β . *FEBS Lett.* 2013 Aug 2;587(15):2399–404.
48. Trauelsen M., Rexen Ulven E., Hjorth S.A., Brvar M., Monaco C., Frimurer T.M., Schwartz T.W. Receptor structure-based discovery of non-metabolite agonists for the succinate receptor GPR91. *Mol Metab.* 2017 Dec;6(12):1585–96.
49. Hamel D., Sanchez M., Duhamel F., Roy O., Honoré J.C., Noueihed B., Zhou T., Nadeau-Vallée M., Hou X., Lavoie J.C., Mitchell G., Mamer O.A., Chemtob S. G-protein-coupled receptor 91 and succinate are key contributors in neonatal postcerebral

- hypoxia-ischemia recovery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014 Feb;34(2):285–93.
50. Regard J.B., Sato I.T., Coughlin S.R. Anatomical profiling of G protein-coupled receptor expression. *Cell.* 2008 Oct 31;135(3):561–71.
 51. Diehl J., Gries B., Pfeil U., Goldenberg A., Mermer P., Kummer W., Paddenberger R. Expression and localization of GPR91 and GPR99 in murine organs. *Cell Tissue Res.* 2016 May;364(2):245–62.
 52. Toma I., Kang J.J., Sipos A., Vargas S., Bansal E., Hanner F., Meer E., Peti-Peterdi J. Succinate receptor GPR91 provides a direct link between high glucose levels and renin release in murine and rabbit kidney. *J Clin Invest.* 2008 Jul;118(7):2526–34.
 53. Correa P.R., Nathanson M.H. Succinate is a paracrine signal for liver damage. *J Hepatol.* 2007 Aug;47(2):262–9.
 54. Aguiar C.J., Andrade V.L., Gomes E.R., Alves M.N., Ladeira M.S., Pinheiro A.C., Gomes D.A., Almeida A.P., Goes A.M., Resende R.R., Guatimosim S., Leite M.F. Succinate modulates Ca(2+) transient and cardiomyocyte viability through PKA-dependent pathway. *Cell Calcium.* 2010 Jan;47(1):37–46.
 55. Aguiar C.J., Rocha-Franco J.A., Sousa P.A., Santos A.K., Ladeira M., Rocha-Resende C., Ladeira L.O., Resende R.R., Botoni F.A., Barrouin Melo M., Lima C.X., Carballido J.M., Cunha T.M., Menezes G.B., Guatimosim S., Leite M.F. Succinate causes pathological cardiomyocyte hypertrophy through GPR91 activation. *Cell Commun Signal.* 2014 Dec 24;12:78.
 56. Yang L., Yu D., Fan H.H., Feng Y., Hu L., Zhang W.Y., Zhou K., Mo X.M. Triggering the succinate receptor GPR91 enhances pressure overload-induced right ventricular hypertrophy. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014 Aug 15;7(9):5415–28.
 57. Sapieha P., Sirinyan M., Hamel D., Zaniolo K., Joyal J.S., Cho J.H., Honoré J.C., Kermorvant-Duchemin E., Varma D.R., Tremblay S., Leduc M., Rihakova L., Hardy P., Klein W.H., Mu X., Mamer O., Lachapelle P., Di Polo A., Beauséjour C., Andelfinger G., Mitchell G., Sennlaub F., Chemtob S. The succinate receptor GPR91 in neurons has a major role in retinal angiogenesis. *Nat Med.* 2008 Oct;14(10):1067–76.
 58. Peruzzotti-Jametti L., Bernstock J.D., Vicario N., Costa A.S.H., Kwok C.K., Leonardi T., Booty L.M., Bicci I., Balzarotti B., Volpe G., Mallucci G., Manferri G., Donegà M., Iraci N., Braga A., Hallenbeck J.M., Murphy M.P., Edenhofner F., Frezza C., Pluchino S. Macrophage-Derived Extracellular Succinate Licenses Neural Stem Cells to Suppress Chronic Neuroinflammation. *Cell Stem Cell.* 2018 Mar 1;22(3):355–368.e13.
 59. Hakak Y., Lehmann-Bruinsma K., Phillips S., Le T., Liaw C., Connolly D.T., Behan D.P. The role of the GPR91 ligand succinate in hematopoiesis. *J Leukoc Biol.* 2009 May;85(5):837–43.
 60. Höglberg C., Gidlöf O., Tan C., Svensson S., Nilsson-Öhman J., Erlinge D., Olde B. Succinate independently stimulates full platelet activation via cAMP and phosphoinositide 3-kinase- β signaling. *J Thromb Haemost.* 2011 Feb;9(2):361–72.
 61. Rubic T., Lametschwandner G., Jost S., Hinteregger S., Kund J., Carballido-Perrig N., Schwärzler C., Junt T., Voshol H., Meingassner J.G., Mao X., Werner G., Rot A., Carballido J.M. Triggering the succinate receptor GPR91 on dendritic cells enhances immunity. *Nat Immunol.* 2008 Nov;9(11):1261–9.
 62. Macaulay I.C., Tijssen M.R., Tijssen-Timmer D.C., Gusnanto A., Steward M., Burns P., Langford C.F., Ellis P.D., Dudbridge F., Zwaginga J.J., Watkins N.A., van der Schoot C.E., Ouwehand W.H. Comparative gene expression profiling of in vitro differentiated megakaryocytes and erythroblasts identifies novel activatory and inhibitory platelet membrane proteins. *Blood.* 2007 Apr 15;109(8):3260–9.
 63. Vempati P., Popel A.S., Mac Gabhann F. Extracellular regulation of VEGF: isoforms, proteolysis, and vascular patterning. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2014 Feb;25(1):1–19.
 64. Chou E., Suzuma I., Way K.J., Opland D., Clermont A.C., Naruse K., Suzuma K., Bowling N.L., Vlahos C.J., Aiello L.P., King G.L. Decreased cardiac expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in insulin-resistant and diabetic States: a possible explanation for impaired collateral formation in cardiac tissue. *Circulation.* 2002 Jan 22;105(3):373–9.
 65. Pappachan J.M., Varughese G.I., Sriraman R., Arunagirinathan G. Diabetic cardiomyopathy: Pathophysiology, diagnostic evaluation and management. *World J Diabetes.* 2013 Oct 15;4(5):177–89.
 66. Abaci A., Oğuzhan A., Kahraman S., Eryol N.K., Unal S., Arinç H., Ergin A. Effect of diabetes mellitus on formation of coronary collateral vessels. *Circulation.* 1999 May 4;99(17):2239–42.
 67. Rzczuch K., Jagielski D., Kołodziej A., Kaczmarek A., Mielnik M., Banasiak W., Ponikowski P. Coronary collateral circulation is less developed when ischaemic heart disease coexists with diabetes. *Kardiol Pol.* 2003 Feb;58(2):85–92.
 68. Islam M.M., Ali A., Khan N.A., Rahman A., Majumder A.S., Chowdhury W.A., Faruque G.M., Faruque M., Jalaluddin M. Comparative study of coronary collaterals in diabetic and nondiabetic patients by angiography. *Mymensingh Med J.* 2006 Jul;15(2):170–5.
 69. Marfella R., Esposito K., Nappo F., Siniscalchi M., Sasso F.C., Portoghese M., Di Marino M.P., Baldi A., Cuzzocrea S., Di Filippo C., Barbosa G., Baldi F., Rossi F., D'Amico M., Giugliano D. Expression of angiogenic factors during acute coronary syndromes in human type 2 diabetes. *Diabetes.* 2004 Sep;53(9):2383–91.
 70. Huang Y., Hickey R.P., Yeh J.L., Liu D., Dadak A., Young L.H., Johnson R.S., Giordano F.J. Cardiac myo-

- cyte-specific HIF-1 α deletion alters vascularization, energy availability, calcium flux, and contractility in the normoxic heart. *FASEB J.* 2004 Jul;18(10):1138–40.
71. Wikenheiser J., Wolfram J.A., Garghesha M., Yang K., Karunamuni G., Wilson D.L., Semenza G.L., Agani F., Fisher S.A., Ward N., Watanabe M. Altered hypoxia-inducible factor-1 α expression levels correlate with coronary vessel anomalies. *Dev Dyn.* 2009 Oct;238(10):2688–700.
 72. Dodd M.S., Sousa Fialho M.D.L., Montes Aparicio C.N., Kerr M., Timm K.N., Griffin J.L., Luiken J.J.F.P., Glatz J.F.C., Tyler D.J., Heather L.C. Fatty Acids Prevent Hypoxia-Inducible Factor-1 α Signaling Through Decreased Succinate in Diabetes. *JACC Basic Transl Sci.* 2018 Aug 28;3(4):485–98.
 73. Ramalho A.R., Toscano A., Pereira P., Girão H., Gonçalves L., Marques C. Hyperglycemia-induced degradation of HIF-1 α contributes to impaired response of cardiomyocytes to hypoxia. *Rev Port Cardiol.* 2017 May;36(5):367–73.
 74. Orchard T.J., Secrest A.M., Miller R.G., Costacou T. In the absence of renal disease, 20 year mortality risk in type 1 diabetes is comparable to that of the general population: a report from the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study. *Diabetologia.* 2010 Nov;53(11):2312–9.
 75. Afkarian M., Sachs M.C., Kestenbaum B., Hirsch I.B., Tuttle K.R., Himmelfarb J., de Boer I.H. Kidney disease and increased mortality risk in type 2 diabetes. *J Am Soc Nephrol.* 2013 Feb;24(2):302–8.
 76. Takiyama Y., Haneda M. Hypoxia in diabetic kidneys. *Biomed Res Int.* 2014;2014:837421.
 77. Schrijvers B.F., Flyvbjerg A., De Zeeuw D.L. The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in renal pathophysiology. *Kidney Int.* 2004 Jun;65(6):2003–17.
 78. Makino H., Miyamoto Y., Sawai K., Mori K., Mukoyama M., Nakao K., Yoshimasa Y., Suga S. Altered gene expression related to glomerulogenesis and podocyte structure in early diabetic nephropathy of db/db mice and its restoration by pioglitazone. *Diabetes.* 2006 Oct;55(10):2747–56.
 79. Ise T., Makino Y., Mizumoto K., Sakagami H., Fujita Y., Honjo J., Takiyama Y., Itoh H., Haneda M. High glucose activates HIF-1-mediated signal transduction in glomerular mesangial cells through a carbohydrate response element binding protein. *Kidney Int.* 2010 Jul;78(1):48–59.
 80. Persson P., Palm F. Hypoxia-inducible factor activation in diabetic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2017 Sep;26(5):345–50.
 81. Krishan P., Singh G., Bedi O. Carbohydrate restriction ameliorates nephropathy by reducing oxidative stress and upregulating HIF-1 α levels in type-1 diabetic rats. *J Diabetes Metab Disord.* 2017 Dec 19;16:47.
 82. Nordquist L., Friederich-Persson M., Fasching A., Liss P., Shoji K., Nangaku M., Hansell P., Palm F. Activation of hypoxia-inducible factors prevents diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2015 Feb;26(2):328–38.
 83. Bohuslavova R., Cerychova R., Nepomucka K., Pavlinkova G. Renal injury is accelerated by global hypoxia-inducible factor 1 α deficiency in a mouse model of STZ-induced diabetes. *BMC Endocr Disord.* 2017 Aug 3;17(1):48.
 84. Yau J.W., Rogers S.L., Kawasaki R., Lamoureux E.L., Kowalski J.W., Bek T., Chen S.J., Dekker J.M., Fletcher A., Grauslund J., Haffner S., Hamman R.F., Ikram M.K., Kayama T., Klein B.E., Klein R., Krishnaiah S., Mayurasakorn K., O'Hare J.P., Orchard T.J., Porta M., Rema M., Roy M.S., Sharma T., Shaw J., Taylor H., Tielsch J.M., Varma R., Wang J.J., Wang N., West S., Xu L., Yasuda M., Zhang X., Mitchell P., Wong T.Y. Meta-Analysis for Eye Disease (META-EYE) Study Group. Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy. *Diabetes Care.* 2012 Mar;35(3):556–64.
 85. Aiello L.P., Avery R.L., Arrigg P.G., Keyt B.A., Jampel H.D., Shah S.T., Pasquale L.R., Thieme H., Iwamoto M.A., Park J.E., et al. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N. Engl. J. Med.* 1994 Dec 1;331(22):1480–7.
 86. Ajlan R.S., Silva P.S., Sun J.K. Vascular Endothelial Growth Factor and Diabetic Retinal Disease. *Semin Ophthalmol.* 2016;31(1–2):40–8.
 87. Urias E.A., Urias G.A., Monickaraj F., McGuire P., Das A. Novel therapeutic targets in diabetic macular edema: Beyond VEGF. *Vision Res.* 2017 Oct;139:221–7.
 88. Ozaki H., Yu A.Y., Della N., Ozaki K., Luna J.D., Yamada H., Hackett S.F., Okamoto N., Zack D.J., Semenza G.L., Campochiaro P.A. Hypoxia inducible factor-1 α is increased in ischemic retina: temporal and spatial correlation with VEGF expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999 Jan;40(1):182–9.
 89. Matsumoto M., Suzuma K., Maki T., Kinoshita H., Tsuike E., Fujikawa A., Kitaoka T. Succinate increases in the vitreous fluid of patients with active proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol.* 2012 May;153(5):896–902.e1.
 90. Hu J., Wu Q., Li T., Chen Y., Wang S. Inhibition of high glucose-induced VEGF release in retinal ganglion cells by RNA interference targeting G protein-coupled receptor 91. *Exp Eye Res.* 2013 Apr;109:31–9.
 91. Hu J., Li T., Du X., Wu Q., Le Y.Z. G protein-coupled receptor 91 signaling in diabetic retinopathy and hypoxic retinal diseases. *Vision Res.* 2017 Oct;139:59–64.
 92. Jeffcoate W.J., Vileikyte L., Boyko E.J., Armstrong D.G., Boulton A.J.M. Current Challenges and Opportunities in the Prevention and Management of Diabetic Foot Ulcers. *Diabetes Care.* 2018 Apr;41(4):645–52.
 93. Knighton D.R., Silver I.A., Hunt T.K. Regulation of wound-healing angiogenesis-effect of oxygen gradients and inspired oxygen concentration. *Surgery.* 1981 Aug;90(2):262–70.
 94. Kalani M., Brismar K., Fagrell B., Ostergren J., Jörneskog G. Transcutaneous oxygen tension and toe

- blood pressure as predictors for outcome of diabetic foot ulcers. *Diabetes Care*. 1999 Jan;22(1):147–51.
95. Catrina S.B., Okamoto K., Pereira T., Brismar K., Poellinger L. Hyperglycemia regulates hypoxia-inducible factor-1alpha protein stability and function. *Diabetes*. 2004 Dec;53(12):3226–32.
96. Lerman O.Z., Galiano R.D., Armour M., Levine J.P., Gurtner G.C. Cellular dysfunction in the diabetic fibroblast: impairment in migration, vascular endothelial growth factor production, and response to hypoxia. *Am. J. Pathol.* 2003 Jan;162(1):303–12.
97. Thangarajah H., Yao D., Chang E.I., Shi Y., Jazayeri L., Vial I.N., Galiano R.D., Du X.L., Grogan R., Galvez M.G., Januszyk M., Brownlee M., Gurtner G.C. The molecular basis for impaired hypoxia-induced VEGF expression in diabetic tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Aug 11;106(32):13505–10.
98. Thangarajah H., Vial I.N., Grogan R.H., Yao D., Shi Y., Januszyk M., Galiano R.D., Chang E.I., Galvez M.G., Glotzbach J.P., Wong V.W., Brownlee M., Gurtner G.C. HIF-1alpha dysfunction in diabetes. *Cell Cycle*. 2010 Jan 1;9(1):75–9.
99. Botusan I.R., Sunkari V.G., Savu O., Catrina A.I., Grünler J., Lindberg S., Pereira T., Ylä-Herttuala S., Poellinger L., Brismar K., Catrina S.B. Stabilization of HIF-1alpha is critical to improve wound healing in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Dec 9;105(49):19426–31.
100. Wetterau M., George F., Weinstein A., Nguyen P.D., Tutela J.P., Knobel D., Cohen Ba.O., Warren S.M., Saadeh P.B. Topical prolyl hydroxylase domain-2 silencing improves diabetic murine wound closure. *Wound Repair Regen*. 2011 Jul–Aug;19(4):481–6.
101. Ceradini D.J., Yao D., Grogan R.H., Callaghan M.J., Edelstein D., Brownlee M., Gurtner G.C. Decreasing intracellular superoxide corrects defective ischemia-induced new vessel formation in diabetic mice. *J. Biol. Chem*. 2008 Apr 18;283(16):10930–8.
102. Consensus Development Conference on Insulin Resistance: 5–6 november 1997. *Diabetes Care* 1998, 21(2):310–14.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Помыткин Игорь Анатольевич*, ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет);
e-mail: ipomytkin@mail.ru

Каркищенко Владислав Николаевич, д.м.н., проф., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России»;
e-mail: scbmt@yandex.ru

Igor A. Pomytkin*, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University;
e-mail: ipomytkin@mail.ru

Vladislav N. Karkischenko, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical Biological Agency of Russia;
e-mail: scbmt@yandex.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

НЕЙРОПРОТЕКТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ АГОНИСТА АЛЬФА-2 АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ МАФЕДИНА НА МОДЕЛИ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЫ У КРЫС

Ю.И. Сысоев^{1,2,*}, С.Г. Дагаев³, Л.Г. Кубарская³, О.Н. Гайкова³, Б.Ч. Узуебунам¹,
К. Модисе¹, Т.Л. Маквана¹, С.В. Оковитый¹

¹ ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Минздрава России

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

² Институт трансляционной биомедицины ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский
государственный университет»

199034, Российская Федерация, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7–9, пом. 1050

³ ФГБУН «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства России»
192019, Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, д. 1

Оценена нейропротекторная активность агониста альфа-2 адренорецепторов 6-оксо-1-фенил-2-(фениламино)-1,6-дигидропиримидин-4-олята натрия (мафедина) в дозах 2,5 и 5 мг/кг на модели черепно-мозговой травмы у крыс. Изучено влияние мафедина на поведение и двигательную функцию травмированных животных в тестах «Стимулирование конечностей», «Открытое поле», «Приподнятый крестообразный лабиринт», «Цилиндр», «Сужающаяся дорожка» и Staircase. Проведен морфометрический анализ объемов повреждения головного мозга крыс на 7 сутки после ЧМТ на фоне недельного введения изучаемого соединения, а также анализ белкового состава спинномозговой жидкости экспериментальных животных. Оценку эффектов мафедина проводили в сравнении с клонидином и на фоне йохимбина. Введение мафедина крысам в дозе 2,5 мг/кг спустя час после ЧМТ и в течение последующих 6 дней приводило к увеличению их общей двигательной активности, улучшению функции передних и задних конечностей без негативного влияния на поведенческие показатели. Изучаемое соединение не влияло на белковый состав СМЖ травмированных крыс, однако у данных животных наблюдалось уменьшение объема повреждения головного мозга на 7 день после травмы и снижение выраженности воспалительных процессов в области повреждения. В сравнении с клонидином при данном режиме введения мафедина был более эффективным в большинстве тестов. Йохимбин отменял большую часть положительных эффектов изучаемого соединения, что позволяет говорить о том, что в положительном эффекте последнего принимают участие альфа-2 адренорецепторы.

Ключевые слова: черепно-мозговая травма, нейропротекторные средства, агонисты альфа-2 адренорецепторов, мафедина, клонидин

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Сысоев Ю.И., Дагаев С.Г., Кубарская Л.Г., Гайкова О.Н., Узуебунам Б.Ч., Модисе К., Маквана Т.Л., Оковитый С.В. Нейропротекторная активность агониста альфа-2 адренорецепторов мафедина на модели черепно-мозговой травмы у крыс. *Биомедицина*. 2019;15(1):62–77. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-1-62-77>

Поступила 29.08.2018

Принята после доработки 07.11.2019

Опубликована 10.03.2019

STUDY OF THE NEUROPROTECTIVE ACTIVITY OF MAFEDINE, AN ALPHA-2 ADRENERGIC RECEPTOR AGONIST, BY MODELING A TRAUMATIC BRAIN INJURY IN RATS

Yuriy I. Sysoev^{1,2,*}, Sergey G. Dagaev³, Larisa G. Kubarskaja³, Olga N. Gaikova³,
Brayt C. Uzuegbunam¹, Kagiso Modise¹, Terry L. Makwana¹, Sergey V. Okovitiy¹

¹ Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical Academy
197376, Russian Federation, Saint Petersburg, Professora Popova str., 14A

² Institute of Translational Biomedicine of the Saint Petersburg State University
199034, Russian Federation, Saint Petersburg, Universitetskaya embankment, 7/9

³ Institute of Toxicology of the Federal Medical Biological Agency of Russia
192019, Russian Federation, Saint Petersburg, Bekhtereva str., 1

In this study, the neuroprotective activity of alpha-2 adrenergic receptor agonist (6-oxo-1-phenyl-2-(phenylamino)-1,6-dihydropyrimidine-4-sodium olate) (mafedine) at the doses of 2.5 and 5 mg/kg was estimated by modelling a traumatic brain injury in rats. The effect of mafedine on rat behaviour and their motor activity was also assessed following such conventional tests as limb placing, open field, elevated plus maze, cylinder, beam walking and staircase. A morphological analysis of the amount of brain damage in the experimental animals was carried out on the 7th day following injury. In addition, the protein composition of the cerebrospinal fluid was investigated. The effects of mafedine were assessed in a comparative perspective with clonidine. The administration of mafedine at a dose of 2.5 mg/kg to rats after brain trauma is shown to lead to an increase in their overall motor activity and an improvement of fore- and hindlimb motor function without any negative behavioural effects. The studied compound is established to have no effect on the protein composition of the cerebrospinal fluid; however, it decreased the overall size of the damaged area by the 7th day after injury. Moreover, mafedine is shown to decrease the intensity of inflammation processes in the damaged area in rats with traumatic brain injuries. In comparison with clonidine, mafedine demonstrated a higher efficacy in most of the tests. Yohimbine abolished most of the beneficial effects of mafedine; therefore, the positive effects of mafedine are likely to be related to its action on alpha-2 adrenergic receptors.

Keywords: traumatic brain injury, neuroprotective agents, alpha-2 adrenergic agonists, mafedine, clonidine

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

For citation: Sysoev Yu.I., Dagaev S.G., Kubarskaja L.G., Gaikova O.N., Uzuegbunam B.C., Modise K., Makwana T.L., Okovitiy S.V. Study of the Neuroprotective Activity of Mafedine, an Alpha-2 Adrenergic Receptor Agonist, by Modeling a Traumatic Brain Injury in Rats. *Biomedicine*. 2019;15(1):62–77. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-1-62-77>

Submitted 29.08.2019

Revised 07.11.2019

Published 10.03.2019

Введение

Черепно-мозговая травма (ЧМТ) является одной из ведущих причин смертности и стойкой утраты нетрудоспособности населения как в РФ, так и за рубежом. Последствиями травматического повреждения мозга являются двигательные нарушения, ухудшение запоминания / потеря памяти, аффективные расстройства, снижение

работоспособности, эпилепсия и др. нарушения [20].

Определенные перспективы в лечении ЧМТ могут быть связаны с использованием агонистов альфа-2 адренорецепторов, которые начиная с 70-х годов прошлого столетия в основном применяли как антигипертензивные средства. Кроме того, у этих препаратов обнаружены

седативные, анальгетические и противотревожные свойства [11]. Позже ряд исследований продемонстрировал, что в условиях эксперимента агонисты альфа-2 адренорецепторов способны снижать выраженность неврологического дефицита, улучшая гистоморфологическую картину головного мозга у животных после инсульта при введении до или во время ишемии [23].

Метаанализ, включающий в себя 9 рандомизированных плацебо-контролируемых исследований с участием 879 пациентов с ишемией головного мозга, показал, что альфа-2 адреномиметик дексмететомидин способен снижать выброс провоспалительных медиаторов и нейроэндокринных гормонов, поддерживать внутричерепной гомеостаз и снижать объем повреждения головного мозга [10].

Целью исследования явилось изучение нейропротекторной активности агониста альфа-2 адренорецепторов мафедина на модели черепно-мозговой травмы у крыс.

Материалы и методы

Эксперименты проводили в соответствии с Приказом Минздрава РФ от 01.04.16 № 199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» после одобрения биоэтической комиссии СПХФУ. Крыс содержали в стандартных условиях вивария на обычном пищевом рационе, со свободным

доступом к воде. Все опытные и контрольные животные были взяты из одного привоза и прошли карантин в течение 14 суток.

Исследования выполнены на 90 белых беспородных крысах самцах массой 250–300 г, полученных из ФГУП ПЛЖ «Рапполово» (Ленинградская обл.). Во всех экспериментальных группах было по 10 животных.

Черепно-мозговую травму моделировали в соответствии с описанной ранее методикой [5]. У наркотизированных хлоралгидратом (400 мг/кг) животных проводили трепанацию черепа в левой лобной части над зоной сенсомоторной коры. Центр трепанационного отверстия находился на 2,5 мм роstralнее и 1,5 мм медиальнее брегмы. Далее по открытой твердой мозговой оболочке наносили дозируемый удар, высверленную пластину возвращали на место, ушивали разрез кожи.

Поведенческие и функциональные тесты у экспериментальных животных проводили на 1-е, 3-и и 7-е сутки. После тестирования на 7-е сутки у крыс осуществляли забор спинномозговой жидкости и мозга для дальнейшего исследования.

На первые сутки после травмы у животных оценивали выраженность неврологического дефицита в тесте «Стимулирование конечностей» (Limb placing test). Тест заключался в ответе задних и передних

Таблица 1. Расписание проводимых экспериментов и процедур
Table 1. Schedule of experiments and procedures

День травмы	1-й день	2-й день	3-й день	4-й день	5-й день	6-й день	7-й день
Утро: ЧМТ ↓ 1 час спустя травмы: введение ЛС	12.00 «Стимулирование конечностей» ↓ Введение ЛС	12.00 Введение ЛС	12.00 «ОП» ↓ «Стимулирование конечностей» ↓ Введение ЛС	12.00 Введение ЛС	12.00 Введение ЛС	12.00 Введение ЛС	12.00 «ПКЛ» ↓ «Цилиндр» ↓ Staircase test ↓ «Сужающаяся дорожка» ↓ Взятие биоматериала

Примечание: «ОП» — открытое поле, «ПКЛ» — приподнятый крестообразный лабиринт.
Note: “ОП” — open field, “ПКЛ” — elevated plus maze.

конечностей на тактильную и проприоцептивную стимуляцию. Процесс тестирования состоял из 7 различных испытаний, результаты выражали в сумме баллов. Для оценки нарушений в работе конечностей использовалась следующая система подсчета: 2 балла — крыса полностью выполняла испытание; 1 балл — крыса выполняла испытание с задержкой в более чем 2 с и/или не полностью; 0 баллов — крыса не отвечала на стимулирование конечности. Максимально возможное суммарное количество баллов было равно 14. Результат выражали в сумме баллов [4].

На третьи сутки повторяли тест «Стимулирование конечностей», дополнительно оценивали общую двигательную (ОДА) и поисково-исследовательскую активность (ПИА) в тесте «Открытое поле» (ОП). ОДА рассчитывали как сумму пересечений квадратов, стоек, заглядываний в норки и грумингов, а ПИА — как сумму стоек и заглядываний. Длительность тестирования составляла 3 мин, результат выражали в сумме баллов.

На 7-е сутки проводили тесты «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ) [18], «Стимулирование конечностей», «Цилиндр», «Сужающаяся дорожка» и Staircase test [4].

В тесте ПКЛ у крыс оценивали время нахождения в открытых (ОР) и закрытых рукавах (ЗР), а также ОДА, складывающуюся из количества заходов в темные/светлые рукава, стоек, выглядываний из темных рукавов, свисаний и грумингов.

В тесте «Цилиндр» оценивали асимметрию использования животным передних конечностей в процессе исследования стенок цилиндра. Для тестирования крысу помещали в цилиндр и проводили видеорегистрацию движений животного в течение 8–10 мин. Просмотр видеозаписи проводили в кадрах в режиме, подсчитывая количество независимого использования латеральной и контралатеральной к месту

повреждения конечностей во время исследования стенки цилиндра после подъема на задние лапы, а также одновременное (совместное) использование обеих лап. Данные представляли как процент использования контралатеральной конечности от общего числа поведенческих актов по формуле:

$$\frac{(\text{контр} + 1/2 \times \text{одновр})}{(\text{ипси} + \text{контр} + \text{одновр})} \times 100,$$

где *контр* — контралатеральная к месту повреждения конечность, *одновр* — одновременное использование передних конечностей, *ипси* — ипсилатеральная к месту повреждения конечность [4].

Тест «Сужающаяся дорожка» использовался для оценки сенсомоторной функции передних и задних конечностей [4]. Установка представляет собой две сужающиеся дорожки длиной 165 см, расположенные друг под другом, причем нижняя имеет бортики для расположения конечностей животного во время соскальзывания с верхней доски. В конце установки располагается черная коробка, являющаяся конечной целью перемещения животного. Перед моделированием черепно-мозговой травмы животных в течение 3 дней приучали пересекать «сужающуюся дорожку». Во время тестирования движения крыс записывались на видеокамеру. В кадрах в режиме просмотра видео для каждой конечности отдельно подсчитывали количество постановок конечности на нижнюю доску (ошибок), количество соскальзываний с верхней доски на нижнюю, а также общее количество шагов. Полученные по трем попыткам данные усреднялись, степень выраженности сенсомоторного дефицита рассчитывалась по формуле в процентах:

$$\frac{\text{Ошибки} + 0,5 \times \text{Соскальзывания}}{\text{Общее кол-во шагов}} \times 100$$

Staircase test («Лестничный тест», «тест Монтойа»), предложенный Montoya et al., позволяет оценить навыки использования передних конечностей при поедании семечек (или шариков корма), находящихся

на различных уровнях двух лестниц, расположенных соответственно с левой и с правой стороны относительно животного. Предварительно, за несколько дней до операции, крысы ежедневно приучались к установке в течение 15–20 мин. Данная процедура позволяет снизить стрессогенность замкнутого пространства во время тестирования, тем самым увеличить количество съеденного корма, что позволяет более точно оценить функцию передних конечностей. С этой же целью за день до тестирования животные лишались корма (при оставшемся свободном доступе к воде). Длительность теста составляла 20–30 мин, по окончании с каждой стороны подсчитывали количество съеденных семечек. Данные представляли как процент съеденных семечек с контралатеральной к месту травмы стороны к их общему количеству с обеих сторон [4].

Важным характерным признаком черепно-мозговой травмы является патологическое повышение проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ). В исследованиях с использованием животных моделей ЧМТ было показано, что у крыс нарушение целостности ГЭБ влечет за собой увеличение содержания в спинномозговой жидкости (СМЖ) альбуминов и других белков с высокой молекулярной массой. Более того, после травмы в СМЖ могут регистрироваться отдельные белки, которые в норме не обнаруживаются, — например, S100-B, GFAP и др. [22]

После проведения всех поведенческих и функциональных тестов на 7-е сутки после травмы животных осуществляли взятие спинномозговой жидкости из *cisterna magna* [16]. Далее ликвор центрифугировали при 2000 об/мин в течение 5 мин, забирали верхний надосадочный слой и замораживали при температуре -40°C для дальнейшего анализа. В образце спинномозговой жидкости определяли белок по методу Lowry [13], после чего

производили его электрофоретическое разделение методом диск-электрофореза [12] в градиенте полиакриламидного геля от 4 до 30%. Полученные форе́зы окрашивали р-ром коллоидного Кумасси G-250 в 15% спиртоуксусной смеси (1:1), отмывку осуществляли 15% спиртоуксусной смесью. Влажный гель сканировали с помощью калиброванного денситометра GS-800 Calibrated Densitometer (Bio-Rad, США). Данные обрабатывали в программе Quantity One 1-D Analysis Software (Bio-Rad, США). Идентификацию масс белка от 10 и более КДа проводили методом средних пропорциональных отрезков на основании молекулярных масс стандартных белков (Bio-Rad, США).

Для определения объема очага повреждения по окончании взятия спинномозговой жидкости у крыс извлекали головной мозг и фиксировали его в течение суток в 10% забуференном формалине. На вибротоме (Campden Instruments Ltd, Великобритания) осуществляли серийные срезы мозга с последующим их окрашиванием раствором крезилвиолета. Объем повреждения (мм^3) определяли с помощью программы анализа изображений ImageJ [8].

Гистологический материал обезжиривали в спиртах возрастающей концентрации, обрабатывали хлороформом и заливали в парафин по стандартной методике [3]. Затем изготавливали гистологические срезы толщиной 5–7 микрон. Все микропрепараты окрашивали гематоксилином и эозином. Просмотр препаратов осуществляли на микроскопе Leica DM 1000 (Leica, Германия), фотосъемку камерой Nikon (Nikon, США). Обработку видеоматериала проводили на персональном компьютере с помощью программы NIS-Elements F 3.2 (Nikon, США).

В качестве объекта исследования было выбрано соединение 6-оксо-1-фенил-2-(фениламино)-1,6-дигидропиримидин-4-олят натрия (мафедин) в дозах 2,5 и 5 мг/кг, обладающее альфа-2 агонистической ак-

тивностью [1]. В качестве референсного средства использовали клонидин в дозе 40 мкг/кг. Выбор доз мафедина был сделан на основании проведенных ранее скрининговых исследований, выбор дозы референсного средства — на основании данных литературы [23]. В эксперименте 1 сравнивали эффективность двух доз мафедина с клонидином. В эксперименте 2 для оценки вклада альфа-2 адренорецепторов в действие мафедина была добавлена группа животных, которым после травмы одновременно с мафедином в эквиволярных количествах вводили антагонист альфа-2 адренорецепторов йохимбин (ООО «Здоровье», Украина). Все фармакологические вещества вводили спустя 1 ч после нанесения травмы и далее каждый день в одно и то же время в течение 6 дней.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программы GraphPad Prism 7.00. Осуществляли проверку нормальности распределения количественных признаков при малом числе наблюдений с использованием W-критерия Шапиро — Уилка, оценивали значимость различий при нормальном распределении количественных признаков с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с постхок-тестом по Тьюки, а при ненормальном распределении — с помощью непараметрического критерия Краскела —

Уоллиса с постхок-тестом по Данну. При проведении морфометрического анализа использовали непараметрический критерий Манна — Уитни. Числовые данные, приводимые в таблицах, представлены в виде среднего арифметического (М) ± ошибка среднего (m). В тесте «Стимулирование конечностей» данные представлены как медиана (нижний квартиль; верхний квартиль).

Результаты исследований

Проведенными исследованиями установлено, что травматическое повреждение зоны сенсомоторной коры у крыс вызывает стойкие нарушения двигательных и поведенческих функций, наиболее выраженные в первые сутки после травмы, с их постепенным восстановлением в течение последующих дней [5].

В эксперименте 1 было установлено, что все испытуемые фармакологические агенты на 7-е сутки давали достоверное улучшение функции передних и задних лап в тесте «Стимулирование конечностей». В то же время достоверных различий между активностью испытуемых лекарственных средств получено не было (табл. 2).

В тесте ОП мафедин, вводимый в дозе 2,5 мг/кг, статистически значимо увеличивал показатель ОДА ($p=0,0096$) по сравнению с контрольной группой. Важно отметить, что при введении данного средства в дозе

Таблица 2. Влияние исследуемых препаратов на функции конечностей животных после ЧМТ в тесте «Стимулирование конечностей» (эксперимент 1). Результаты представлены в сумме баллов

Table 2. Effects of the studied drugs on limb functions in experimental animals after traumatic brain injury in the Limb Placing test (Experiment 1). The results are presented as the sum of points

Группа	1-й день	3-й день	7-й день
Интактные	14 (14; 14)**	14 (14; 14)**	14 (14; 14)**
Контроль (травма)	0 (0; 1,5)	5 (4; 7)	8 (6; 8)
Клонидин, 40 мкг/кг	0,5 (0; 3,5)	9,5 (7,25; 12)**	10 (9,5; 12)**
Мафедин 2,5 мг/кг	0 (0; 4)	8 (5; 10)	12 (7; 12)*
Мафедин 5 мг/кг	2 (0,25; 3)	9 (7,5; 9,25)**	11 (9,25; 12)**

Примечание: * — достоверное отличие ($p<0,05$), ** — достоверное отличие ($p<0,01$) от соответствующего контрольного показателя.

Note: * — significant difference ($p<0.05$), ** — significant difference ($p<0.01$) from the corresponding control indicator.

5 мг/кг положительный эффект не наблюдался. Клонидин не продемонстрировал статистически значимого улучшения показателей ОДА и ПИА в данном тесте (табл. 3).

Ни клонидин, ни мафедин в обеих дозах не приводили к изменению времени нахождения крыс в открытых и закрытых рукавах в тесте ПКЛ. ОДА и время нахождения в центре лабиринта у животных данных групп также не отличались от контроля.

Ни одно из испытуемых лекарственных средств не увеличивало частоту использования контралатеральной лапы в тесте «Цилиндр».

В тесте «Сужающаяся дорожка» как клонидин, так и мафедин в обеих дозах улучшали состояние двигательной функции передней

конечности. Мафедин в дозах 2,5 и 5 мг/кг в данном тесте также улучшал функцию задней конечности травмированных крыс ($p=0,0381$ и $p=0,0205$ соответственно). Достоверных различий между результатами двух доз мафедина получено не было (табл. 4).

Введение мафедина или клонидина травмированным животным несколько улучшало функцию передних конечностей в Staircase тесте. Однако из-за большого разброса результатов внутри группы данные улучшения не были статистически достоверными.

В эксперименте 2 в тесте «Стимулирование конечностей» мафедин в дозе 2,5 мг/кг на 3-е сутки достоверно улучшал функцию передних и задних конечностей травмиро-

Таблица 3. ОДА и ПИА животных в тесте ОП на 3-и сутки после травмы (эксперимент 1)

Table 3. Total motor activity and exploratory activity of the experimental animals in the Open Field test on the 3rd day after injury (Experiment 1)

Группа	ОДА, баллы	ПИА, баллы
Интактные	26,4±3,1**	8,1±1,8**
Контроль (травма)	2,4±1,5	0,4±0,4
Клонидин, 40 мкг/кг	16,9±3,7	2,2±0,8
Мафедин 2,5 мг/кг	31,9±10,6**	3,3±1,3
Мафедин 5 мг/кг	3,2±1,5	0,7±0,7

Примечание: * — достоверное отличие ($p<0,05$), ** — достоверное отличие ($p<0,01$) от соответствующего контрольного показателя.

Note: * — significant difference ($p<0.05$), ** — significant difference ($p<0.01$) from the corresponding control indicator.

Таблица 4. Степень выраженности сенсомоторного дефицита передней (СД-П) и задней (СД-З) контралатеральных конечностей животных в тесте «Сужающаяся дорожка» на 7-е сутки после травмы (эксперимент 1)

Table 4. The severity of sensory-motor deficit in the anterior (SD-A) and hind (SD-H) contralateral limbs of the experimental animals in the Beam Walking test on the 7th day after injury (Experiment 1)

Группа	СД-П, %	СД-З, %
Интактные	1,5±0,5**	2,7±0,7**
Контроль (травма)	29,2±3,4	25,5±4,8
Клонидин, 40 мкг/кг	8,1±0,8**	17,2±1,4
Мафедин 2,5 мг/кг	9,7±1,5**	14,5±2,3*
Мафедин 5 мг/кг	8,7±2,1**	13,3±2,5*

Примечание: СД-П — сенсомоторный дефицит передней лапы, СД-З — сенсомоторный дефицит задней лапы; * — достоверное отличие ($p<0,05$) от соответствующего контрольного показателя.

Note: СД-П (Rus.) is the sensory-motor deficit of the anterior paw, СД-З (Rus.) is the sensory-motor deficit of the hind paw; * — significant difference ($p<0.05$) from the corresponding control indicator.

ванных животных в данном тесте по сравнению с контролем ($p=0,0484$). Йохимбин отменял положительный эффект мафедина в данном тесте на 3-е сутки после травмы ($p=0,0071$) (рис. 1).

В тесте ОП в эксперименте 2, как и в эксперименте 1, мафедин увеличивал ОДА у травмированных животных ($p=0,0158$), при этом введение йохимбина в эквимольных количествах блокировало данный эффект ($p=0,0012$). Мафедин не продемонстрировал статистически значимого увеличения ПИА, однако было получено достоверное отличие между группами мафедина и мафедина с йохимбином ($p=0,0238$) (рис. 2).

Мафедин в дозе 2,5 мг/кг не оказывал влияния на поведение травмированных животных в тесте ПКЛ в эксперименте 2. Однако одновременное введение йохимбина с мафедином приводило к достоверному снижению времени нахождения в открытых рукавах ($p=0,0196$) и общей двигательной активности у травмированных животных ($p=0,0030$) по сравнению с группой мафедина.

В эксперименте 2 мафедин в дозе 2,5 мг/кг увеличивал частоту использования контралатеральной конечности травмированными животными в тесте «Цилиндр» ($p=0,0361$), при этом йохимбин не отменял его положительного эффекта.

В тесте «Сужающаяся дорожка» в эксперименте 2 мафедин в дозе 2,5 мг/кг, как и в эксперименте 1, улучшал функцию передней и задней конечностей у травмированных животных. Введение йохимбина не отменяло положительного эффекта мафедина.

В эксперименте 2 так же, как и в эксперименте 1, мафедин в дозе 2,5 мг/кг не оказывал статистически значимого положительного эффекта на функцию передней контралатеральной конечности в тесте Staircase.

Объем повреждения головного мозга у крыс на 7-е сутки после недельного введения мафедина в дозе 2,5 мг/кг был достоверно меньше по сравнению с контрольной группой (рис. 3). Введение же клонидина

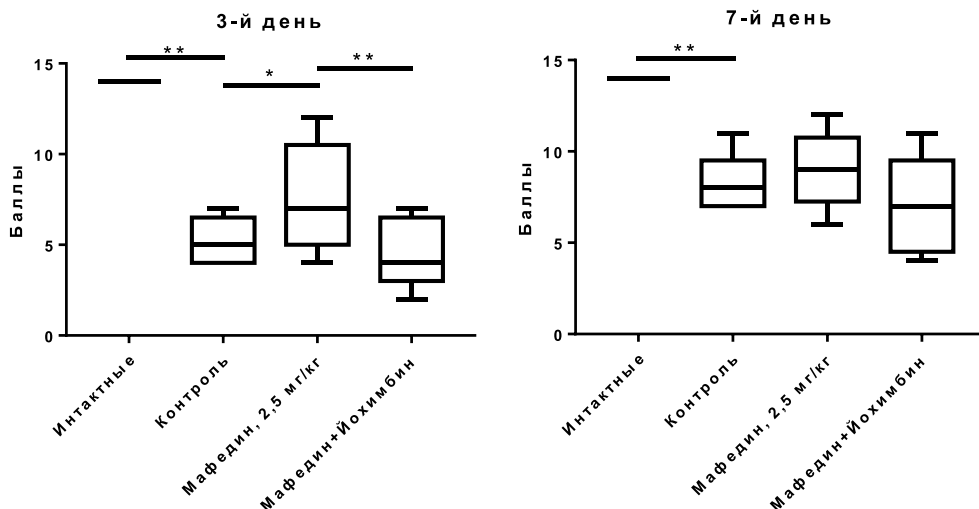


Рис. 1. Влияние исследуемых препаратов на функции конечностей животных после ЧМТ в тесте «Стимулирование конечностей» (эксперимент 2). * — достоверное отличие ($p<0,05$), ** — достоверное отличие ($p<0,01$) от соответствующего контрольного показателя.

Fig. 1. Effects of the studied drugs on limb function in experimental animals after traumatic brain injury in the Limb Placing test (Experiment 2). * — significant difference ($p<0,05$), ** — significant difference ($p<0,01$) from the corresponding control indicator.

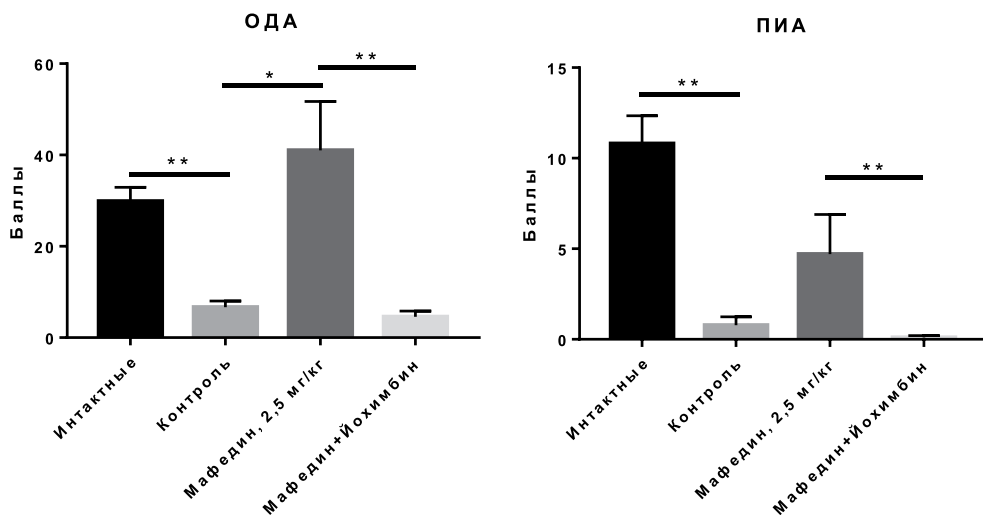


Рис. 2. ОДА и ПИА животных в тесте ОП на 3-и сутки после травмы (эксперимент 2). * — достоверное отличие ($p < 0,05$), ** — достоверное отличие ($p < 0,01$) от соответствующего контрольного показателя.

Fig. 2. Total motor activity and exploratory activity of the experimental animals in the Open Field test on the 3rd day after injury (Experiment 2). * — significant difference ($p < 0,05$), ** — significant difference ($p < 0,01$) from the corresponding control indicator.

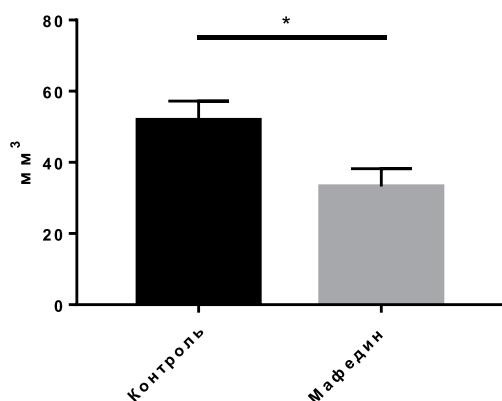


Рис. 3. Влияние мафедина на объем повреждения головного мозга крыс после ЧМТ. * — достоверное отличие ($p < 0,05$) от соответствующего контрольного показателя.

Fig. 3. Effect of mafedin on the amount of brain damage in rats after traumatic brain injury. * — significant difference ($p < 0,05$) from the corresponding control indicator.

в течение недели не приводило к статистически значимому уменьшению объема повреждения.

При гистологическом исследовании в ткани мозга крыс после травмы в нетравмированной полушарии наблюдались реактивные изменения, проявившиеся

в основном в значительном расширении периваскулярных пространств, цитоархитектоника коры не была нарушена (рис. 4А). В противоположном полушарии отчетливо виден очаг повреждения ткани мозга, где на большом протяжении структуры коры и белого вещества не определяются, видны небольшие свободные пространства, но в основном разрушенная ткань замещена зернистыми шарами — макрофагами, утилизирующими разрушенную ткань мозга (рис. 4Б). У животных с такой же травмой, но получавших в качестве лечения мафедин в дозе 2,5 мг/кг, очаг некроза также определяется, видны небольшие полости, мелкие кровоизлияния и небольшие участки ткани, лишённые клеток, но, в отличие от животных контрольной группы, в этом случае зернистые шары практически отсутствуют, а количество глиальных клеток и тканевых макрофагов в некоторых участках не увеличено, в других даже уменьшено (рис. 4В).

У крыс, перенесших черепно-мозговую травму, на 7-е сутки наблюдали достоверное увеличение содержания общего белка по сравнению с контрольными животными

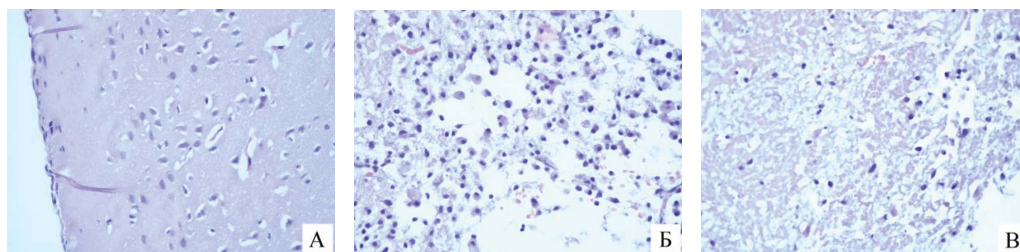


Рис. 4. А — головной мозг здорового полушария травмированных животных на 7-е сутки после травмы. Цитоархитектоника коры сохранена, периваскулярные пространства резко расширены. Б — головной мозг травмированного полушария животных на 7-е сутки после травмы. Ткань мозга разрушена, замещена грануляционной тканью с большим количеством зернистых шаров. В — ткань головного мозга травмированного полушария животных, которым вводили мафедин в дозе 2,5 мг/кг в течение 7 дней. Ткань мозга разрушена, нейропил несколько разрежен, количество глиальных клеток и макрофагов не увеличено. А, Б, В — окраска гематоксилином и эозином. ув. $\times 400$.

Fig. 4. А — the brain of the healthy hemisphere in the experimental animals on the 7th day after injury. The cytoarchitecture of the cortex is preserved, the perivascular spaces are markedly enlarged. Б — the brain of the injured hemisphere in the experimental animals on the 7th day after injury. The brain tissue is destroyed and replaced with a granulation tissue with a large number of granular balls. В — the brain tissue of the injured hemisphere in experimental animals having been injected with mafedin at a dose of 2.5 mg/kg for 7 days. The brain tissue is destroyed, the neuropil is somewhat sparse, the number of glial cells and macrophages is not increased. А, Б, В — stained with hematoxylin and eosin, magn. $\times 400$.

Таблица 5. Содержание общего белка и его фракций в СМЖ крыс на 7-е сутки после травмы

Table 5. Amount of the total protein and its fractions in the spinal fluid of rats on the 7th day after injury

Показатель	Интактные	Контроль (травма)	Мафедин	Клонидин
Общий белок, мкг/мл	212,0 $\pm$ 24,1	432,7 $\pm$ 60,9*	555,9 $\pm$ 108,0	324,0 $\pm$ 26,4
165–260 кДа, мкг/мл	50,6 $\pm$ 24,8	92,6 $\pm$ 23,7	190,4 $\pm$ 49,9	74,0 $\pm$ 30,2
135–150 кДа, мкг/мл	51,9 $\pm$ 10,6	134,6 $\pm$ 45,8	166,2 $\pm$ 56,5	81,1 $\pm$ 9,3
69–85 кДа, мкг/мл	65,7 $\pm$ 25,5	193,3 $\pm$ 18,1*	108,5 $\pm$ 37,3	109,2 $\pm$ 33,4
61 кДа, мкг/мл	16,6 $\pm$ 5,3	46,9 $\pm$ 10,3*	41,8 $\pm$ 3,0	30,1 $\pm$ 11,9
60 кДа, мкг/мл	27,2 $\pm$ 7,9	100,8 $\pm$ 29,5*	110,8 $\pm$ 13,5	49,7 $\pm$ 12,3

Примечание: * — достоверное отличие ($p < 0,05$) по сравнению с интактными животными. Статистическая значимость различий оценивалась с помощью непараметрического критерия Краскела — Уоллиса с постхок-тестом по Данну.

Note: * — significant difference ($p < 0.05$) compared with intact animals. The statistical significance of differences was assessed using the non-parametric Kruskal — Wallis test with a post hoc Dunn's test.

ми ($p = 0,0426$). При электрофоретическом разделении белков СМЖ крыс отчетливо определялись полосы белков, которые можно условно разделить на несколько диапазонов относительно их молекулярных масс. У травмированных животных наблюдали достоверное увеличение фракций 60, 61 и 69–85 кДа. Ни мафедин, ни клонидин не оказывали достоверного влияния на содержание общего белка в СМЖ и его фракций (табл. 5).

Обсуждение результатов

Проведенными исследованиями установлено, что мафедин улучшал функцию передних и задних конечностей крыс в тестах «Стимулирование конечностей» и «Сужающаяся дорожка», однако не оказывал достоверного эффекта на частоту использования контралатеральной конечности в тестах «Цилиндр» и Staircase. Такая избирательность действия может быть связана с тем, что он действует только на

определенные системы в пределах ЦНС, инициирующие и/или контролирующие движения. При выполнении тестов «Стимулирование конечностей» и «Сужающаяся дорожка» участвует в большей степени экстрапирамидная система и спинально-стволовые рефлексы, в то время как в тестах «Цилиндр» и Staircase реализует свое действие пирамидная система, одной из ключевых функциональных структур которой является двигательная кора. Полученные результаты позволяют предполагать, что мафедин реализует свое действие именно через модуляцию спинально-стволовых рефлексов. Данное предположение может быть подкреплено тем, что другие агонисты альфа-2 адренорецепторов участвуют в инициации и/или модуляции локомоторных и постуральных рефлексов [6], которые по своему происхождению являются спинально-стволовыми [2].

Несмотря на данную избирательность действия, в тестах «Цилиндр» и «Сужающаяся дорожка» наблюдалась некоторая положительная динамика, например, в эксперименте 2 в тесте «Цилиндр» мафедин улучшал двигательную функцию передней лапы. Данные эффекты можно объяснить тем, что мафедин все же в некоторой степени действует на работу пирамидной системы, что не противоречит предположению о его действии на спинально-стволовые рефлексы, хотя в двигательной коре крыс в большей степени преобладают альфа-1 адренорецепторы [25].

Наиболее вероятным объяснением данной особенности действия мафедина представляется то, что при моделировании травмы глубина повреждения головного мозга у крыс была достаточно большой. Тем самым двигательная кора попадала не в область «полутени», а в область ядра, т.е. очага некроза, следовательно, тестируемые соединения уже не могли оказать нейропротекторного действия, и в тестах, где в большей степени требовалось участие

коры, животные, которым вводили мафедин или клонидин, были не способны показать достаточно высокий результат.

В отличие от клонидина, мафедин увеличивал общую двигательную активность травмированных крыс в тесте ОП. Увеличение ОДА может свидетельствовать о психостимулирующем действии, что в классическом понимании является нехарактерным для агонистов альфа-2 адренорецепторов [21]. Это различие в спектре фармакологического действия, возможно, обусловлено тем, что мафедин может действовать на другие подтипы альфа-2 адренорецепторов, в отличие от клонидина. Клонидин в большей степени активен по отношению к альфа-2_A адренорецепторам [9], хотя в классическом понимании он является неизбирательным агонистом. В то же время в проводимых тестах множественное сравнение не показало достоверной разницы между результатами групп мафедина в дозе 2,5 мг/кг и клонидина. Несмотря на то, что на моделях ишемии головного мозга доза клонидина 40 мкг/кг указывается как наиболее эффективная [23], снижение или увеличение дозы может привести к тому, что эффекты мафедина и клонидина будут одинаковыми. Данное предположение подтверждается тем, что клонидин в зависимости от дозы может вызывать у экспериментальных животных как анксиогенное, так и анксиолитическое действие [17]. Дозозависимость эффекта наблюдалась и у мафедина: доза 2,5 мг/кг, в отличие от дозы 5 мг/кг, увеличивала общую двигательную активность травмированных животных.

Ни мафедин, ни клонидин не изменяли времени нахождения крыс с ЧМТ в центре, в открытых и закрытых «рукавах», а также ОДА в тесте ПКЛ, что может говорить о том, что в данных дозах при курсовом введении изучаемые соединения не оказывают влияния на поведение и, в частности, уровень тревожности травмированных животных.

Поскольку йохимбин отменял положительные эффекты мафедина в тестах «Стимулирование конечностей» и ОП, можно говорить, что улучшение функций передних и задних конечностей, а также увеличение общей двигательной активности животных обусловлено действием мафедина на альфа-2 адренорецепторы. Важно, что в тесте ПКЛ при одновременном введении с мафедином йохимбина у животных снижались время в открытых «рукавах», а также ОДА, что может быть связано с тем, что йохимбин блокирует не только альфа-2 адренорецепторы, но также и различные подтипы серотониновых рецепторов [14]. Снижение серотонинергической иннервации в головном мозге у крыс приводит к депрессивно- и тревожно-подобному поведению [7], которое может проявляться в снижении времени нахождения в открытых «рукавах» и снижению общей двигательной активности в тесте ПКЛ [18].

Предполагается, что возможными механизмами нейропротекторного действия агонистов альфа-2 адренорецепторов могут быть:

1) снижение избыточного выброса норадреналина и глутамата из синапсов нейронов при возникающем энергетическом дисбалансе [24];

2) закрытие потенциал-зависимых кальциевых каналов, открываемых при NMDA-деполяризации и вызывающих избыточное накопление Ca^{2+} в нейронах [15];

3) стимуляция синтеза трофических факторов в ЦНС [19].

Можно предположить, что в ответ на травматическое повреждение мафедин, подобно другим альфа-2 адреномиметикам, способен увеличивать продукцию нейротрофинов, тем самым снижая выраженность неврологического дефицита у травмированных животных. Однако молекулярные массы данных белков достаточно малы (<20 кДа), что не позволяет их идентифицировать простым электрофоретическим разделением спинномозговой жидкости травмированных крыс.

Для оценки возможности данного механизма вносить свой вклад в положительный эффект мафедина необходимы дальнейшие исследования.

Поскольку мафедин не уменьшал содержание общего белка спинномозговой жидкости у травмированных крыс, а также не снижал содержание ни одной из основных фракций белков, можно говорить о том, что механизм положительного действия мафедина не связан с нормализацией проницаемости ГЭБ.

Морфологический анализ показал, что введение мафедина животным, перенесшим черепно-мозговую травму, приводит к снижению интенсивности воспаления в области повреждения. Скорее всего, данный эффект является не самостоятельным, а следствием снижения выброса провоспалительных факторов (например ФНО- α и IL-6), т.е. снижения интенсивности воспалительного процесса под влиянием альфа-2 адреномиметиков при повреждении головного мозга [10].

Заключение

Таким образом, введение мафедина крысам в дозе 2,5 мг/кг спустя 1 ч после ЧМТ и в течение последующих 6 дней приводит к увеличению их общей двигательной активности и улучшению функции передних и задних конечностей без влияния на поведенческие показатели. При этом происходит уменьшение объема повреждения головного мозга и снижение выраженности воспалительных процессов в области повреждения. В сравнении с клонидином при данном режиме введения мафедин более эффективен в большинстве тестов. Йохимбин отменяет большинство положительных эффектов изучаемого соединения, что позволяет говорить о том, что в положительном действии последнего принимают участие альфа-2 адренорецепторы. Отсутствие влияния мафедина на общий белок и белковый состав СМЖ травмированных крыс позволяет говорить о том, что его положи-

тельный эффект не связан с нормализацией проницаемости ГЭБ.

Выводы

1. Мафедин (6-оксо-1-фенил-2-(фениламино)-1,6-дигидропириимидин-4-олята натрия) способствует снижению неврологического дефицита и увеличению общей двигательной активности у крыс после черепно-мозговой травмы, вызванной методом контролируемого кортикального ушиба.

2. Исследуемое соединение у крыс, перенесших черепно-мозговую травму, позво-

ляет достичь уменьшения объема повреждения головного мозга, а также снижения интенсивности воспалительного процесса в очаге повреждения.

3. Наибольшая нейрореабилитационная активность мафедина наблюдается в дозе 2,5 мг/кг, сопоставимая с таковой клонидина в дозе 40 мкг/кг.

4. В реализации фармакологического эффекта мафедина основной эффект оказывает его агонистическое влияние на альфа-2 адренорецепторы, а не на процессы проницаемости ГЭБ после ЧМТ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анисимова Н.А. Фармакологическая характеристика мафедина: дис. ... канд. биол. наук. — Ленинградский химико-фармацевтический институт. — Л., 1984.
2. Бернштейн Н.А. Очерки о физиологии движений и физиологии активности. — М.: Медицина, 1966. — 58 с.
3. Меркулов Г.А. Курс патогистологической техники. — Л.: Медгиз, 1961. — 340 с.
4. Силачев Д.Н. Изучение новых нейротропиков на модели фокальной ишемии головного мозга: дис. ...канд. биол. наук. — Моск. гос. университет им. М.В. Ломоносова. — М., 2009.
5. Сысоев Ю.И., Оковитый С.В., Узгербунан Б.Ч. Влияние нового производного диэтиламиноэтанола на выраженность неврологического дефицита у крыс после черепно-мозговой травмы // Биомедицина. — 2018. — № 2. — С. 95–105.
6. Сысоев Ю.И., Мусиенко П.Е., Оковитый С.В. Влияние адренергических и холинергических средств на восстановление двигательных функций при поражении ЦНС // Экспериментальная и клиническая фармакология. — 2017. — Т. 80. — № 7. — С. 37–44.
7. Albert P.R., Vahid-Ansari F., Luckhart C. Serotonin-prefrontal cortical circuitry in anxiety and depression phenotypes: pivotal role of pre- and post-synaptic 5-HT_{1A} receptor expression // Front Behav Neurosci. — 2014. — Vol. 8. — Pp. 199.
8. Isaev N.K., Novikova S.V., Stelmashook E.V., et al. Mitochondria-targeted plastoquinone antioxidant skq1 decreases trauma-induced neurological deficit in rat // Biochemistry (Moscow). — 2012. — Vol. 77, № 9. — P. 996–999.
9. Jasper J.R., Lesnick J.D., Chang L.K., et al. Ligand efficacy and potency at recombinant alpha2 adrenergic receptors: agonist-mediated [35S] GTPgammaS binding // Biochem Pharmacol. — 1998. — Vol. 55. — Pp. 1035–1043.
10. Jiang L., Hu M., Lu Y., et al. The protective effects of dexmedetomidine on ischemic brain injury: A meta-analysis // J Clin Anesth. — 2017. — Vol. 40. — Pp. 25–32.
11. Kamibayashi T., Maze M. Clinical uses of α -adrenergic agonists // Anesthesiology. — 2000. — Vol. 93. — Pp. 1345–1349.
12. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. — 1970. — Vol. 227. — Pp. 680–685.
13. Lowry O.H. Protein measurement with the folin phenol reagent // J. Biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — Pp. 265–275.
14. Millan M.J., Newman-Tancredi A., Audinot V., et al. Agonist and antagonist actions of yohimbine as compared to fluparoxan at alpha (2)-adrenergic receptors (AR)s, serotonin (5-HT) (1A), 5-HT(1B), 5-HT(1D) and dopamine D (2) and D (3) receptors. Significance for the modulation of frontocortical monoaminergic transmission and depressive states // Synapse. 2000. — Vol. 35, No. 2. — Pp. 79–95.
15. Nacif-Coelho C., Correa-Sales C., Chang L.L., Maze M. Perturbation of ion channel conductance alters the hypnotic response to the alpha 2-adrenergic agonist dexmedetomidine in the locus coeruleus of the rat // Anesthesiology. — 1994. — Vol. 81. — Pp. 1527–1534.
16. Nirogi R., Kandikere V., Mudigonda K., et al. A simple and rapid method to collect the cerebrospinal fluid of rats and its application for the assessment of drug penetration into the central nervous system // J. Neurosci Methods. — 2009. — Vol. 178, No. 1. — Pp. 116–119.
17. Silva R.H., Kameda S.R., Carvalho R.C., et al. Anxiogenic effect of sleep deprivation in the elevated plus-maze test in mice // Psychopharmacology (Berl). — 2004. — Vol. 176. — Pp. 115–122.
18. Walf A.A., Frye C.A. The use of elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents // Nat Protoc. — 2007. — Vol. 2, No. 2. — Pp. 322–328.

19. Wen R., Cheng T., Li Y., et al. Alpha-2 adrenergic agonists induce basic fibroblast growth factor expression in photoreceptors in vivo and ameliorate light damage // *J Neurosci.* — 1996. — Vol. 16, No. 19. — Pp. 5986–5992.
20. Wilson L., Stewart W., Dams-O'Connor K., et al. The chronic and evolving neurological consequences of traumatic brain injury // *Lancet Neurol.* — 2017. — Vol. 16. — No. 10. — Pp. 813–825.
21. Wrenn C.C., Heitzer A.M., Roth A.K., et al. Effects of clonidine and methylphenidate on motor activity in Fmr1 knockout mice // *Neurosci Lett.* — 2015. — Vol. 585. — Pp. 109–113.
22. Zetterberg H., Smith D.H., Blennow K. Biomarkers of mild traumatic brain injury in cerebrospinal fluid and blood // *Nat Rev neurol.* — 2013. — Vol. 9, No. 4. — Pp. 201–210.
23. Zhang Y. Clonidine preconditioning decreases infarct size and improves neurological outcome from transient forebrain ischaemia in the rat // *Neuroscience.* — 2004. — Vol. 125, No. 3. — Pp. 625–631.
24. Zhang Y., Kimelberg H.K. Neuroprotection by alpha 2-adrenergic agonists in cerebral ischemia // *Curr. Neuropharmacol.* — 2005. — Vol. 3, No. 4. — Pp. 317–323.
25. Zilles K., Qü M., Schleicher A. Regional distribution and heterogeneity of alpha-adrenoceptors in the rat and human central nervous system // *J. Hirnforsch.* — 1993. — Vol. 34, No. 2. — Pp. 123–132.

REFERENCES

1. Anisimova N.A. Farmakologicheskaya karakteristika mafedina [Pharmacological characterization of mafedine]: ... dis. kand. biol. nauk [the dissertation ... candidate of biological sciences]. Leningrad chemical-pharmaceutical institute. Leningrad, 1984. (In Russian).
2. Bernshteyn N.A. Ocherki o fiziologii dvizhenij i fiziologii aktivnosti [Essays on the physiology of movements and physiology of activity]. Moscow: Medicina. 1966. 58 p. (In Russian).
3. Merkulov G.A. Kurs patogistologicheskoy tekhniki [Course of pathohistological techniques]. Leningrad: MEDGIZ, 1961. 340 p. (In Russian).
4. Silachev D.N. Izuchenie novyh nejroprotektorov na modeli fokal'noj ishemii golovnogo mozga [The study of new neuroprotectors on the model of focal cerebral ischemia]: dis. ... kand. biol. nauk [the dissertation ... candidate of biological sciences]. Lomonosov Moscow State University. Moscow, 2009. (In Russian).
5. Sysoev Yu.I., Okovityj S.V., Uzuegbunam B.Ch. Vliyaniye novogo proizvodnogo diehtilaminoehtanola na vyrazhennost' nevrologicheskogo defitsita u krysa posle cherepno-mozgovoy travmy [The influence of new diethylaminoethanol compound on the neurologic deficit in rats after traumatic brain injury]. *Biomedicina [Biomedicine]*. 2018. No. 2. Pp. 95–105. (In Russian).
6. Sysoev Yu.I., Musienko P.E., Okovityj S.V. Vliyaniye adrenergicheskikh i holinegicheskikh sredstv na vosstanovlenie dvigatel'nykh funktsij pri porazhenii CNS [Influence of cholinergic and adrenergic agents on the recovery of locomotor functions after CNS damage]. *Jeksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya [Experimental and clinical pharmacology]*. 2017. T. 80. No. 7. Pp. 37–44. (In Russian).
7. Albert P.R., Vahid-Ansari F., Luckhart C. Serotonin-prefrontal cortical circuitry in anxiety and depression phenotypes: pivotal role of pre- and post-synaptic 5-HT1A receptor expression. *Front Behav Neurosci.* 2014. Vol. 8. Pp. 199.
8. Isaev N.K., Novikova S.V., Stelmashook E.V., et al. Mitochondria-targeted plastoquinone antioxidant skqr1 decreases trauma-induced neurological deficit in rat. *Biochemistry (Moscow)*. 2012. Vol. 77, № 9. P. 996–999.
9. Jasper J.R., Lesnick J.D., Chang L.K., et al. Ligand efficacy and potency at recombinant alpha2 adrenergic receptors: agonist-mediated [35S] GTPgammaS binding. *Biochem Pharmacol.* 1998. Vol. 55. Pp. 1035–1043.
10. Jiang L., Hu M., Lu Y., et al. The protective effects of dexmedetomidine on ischemic brain injury: A meta-analysis. *J Clin Anesth.* 2017. Vol. 40. Pp. 25–32.
11. Kamibayashi T., Maze M. Clinical uses of α_2 -adrenergic agonists. *Anesthesiology.* 2000. Vol. 93. Pp. 1345–1349.
12. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970. Vol. 227. Pp. 680–685.
13. Lowry O.H. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951. Vol. 193. Pp. 265–275.
14. Millan M.J., Newman-Tancredi A., Audinot V., et al. Agonist and antagonist actions of yohimbine as compared to fluparoxan at alpha (2)-adrenergic receptors (AR)s, serotonin (5-HT) (1A), 5-HT(1B), 5-HT(1D) and dopamine D (2) and D (3) receptors. Significance for the modulation of frontocortical monoaminergic transmission and depressive states. *Synapse.* 2000. Vol. 35. No. 2. Pp. 79–95.
15. Nacif-Coelho C., Correa-Sales C., Chang L.L., Maze M. Perturbation of ion channel conductance alters the hypnotic response to the alpha 2-adrenergic agonist dexmedetomidine in the locus coeruleus of the rat. *Anesthesiology.* 1994. Vol. 81. Pp. 1527–1534.
16. Nirogi R., Kandikere V., Mudigonda K., et al. A simple and rapid method to collect the cerebrospinal fluid of rats and its application for the assessment of drug penetration into the central nervous system. *J. Neurosci Methods.* 2009. Vol. 178. No. 1. Pp. 116–119.

17. Silva R.H., Kameda S.R., Carvalho R.C., et al. Anxiogenic effect of sleep deprivation in the elevated plus-maze test in mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 2004. Vol. 176. Pp. 115–122.
18. Walf A.A., Frye C.A. The use of elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc*. 2007. Vol. 2. No. 2. Pp. 322–328.
19. Wen R., Cheng T., Li Y., et al. Alpha-2 adrenergic agonists induce basic fibroblast growth factor expression in photoreceptors in vivo and ameliorate light damage. *J Neurosci*. 1996. Vol. 16. No. 19. Pp. 5986–5992.
20. Wilson L., Stewart W., Dams-O'Connor K., et al. The chronic and evolving neurological consequences of traumatic brain injury. *Lancet Neurol*. 2017. Vol. 16. No. 10. Pp. 813–825.
21. Wrenn C.C., Heitzer A.M., Roth A.K., et al. Effects of clonidine and methylphenidate on motor activity in Fmr1 knockout mice. *Neurosci Lett*. 2015. Vol. 585. Pp. 109–113.
22. Zetterberg H., Smith D.H., Blennow K. Biomarkers of mild traumatic brain injury in cerebrospinal fluid and blood. *Nat Rev neurol*. 2013. Vol. 9. No. 4. Pp. 201–210.
23. Zhang Y. Clonidine preconditioning decreases infarct size and improves neurological outcome from transient forebrain ischaemia in the rat. *Neuroscience*. 2004. Vol. 125. No. 3. Pp. 625–631.
24. Zhang Y., Kimelberg H.K. Neuroprotection by alpha 2-adrenergic agonists in cerebral ischemia. *Curr. Neuropharmacol*. 2005. Vol. 3. No. 4. Pp. 317–323.
25. Zilles K., Qü M., Schleicher A. Regional distribution and heterogeneity of alpha-adrenoceptors in the rat and human central nervous system. *J. Hirnforsch*. 1993. Vol. 34. No. 2. Pp. 123–132.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Сысоев Юрий Игоревич*, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России, Институт трансляционной биомедицины ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»;
e-mail: susoyev92@mail.ru

Yuriy I. Sysoev*, Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical Academy, Institute of Translational Biomedicine of the Saint Petersburg State University;
e-mail: susoyev92@mail.ru

Дагаев Сергей Глебович, к.м.н., ФГБУН «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства России»

Sergey G. Dagaev, Cand. Sci. (Med.), Institute of Toxicology of the Federal Medical Biological Agency of Russia

Кубарская Лариса Георгиевна, к.б.н., ФГБУН «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства России»;
e-mail: larkub@yandex.ru

Larisa G. Kubarskaja, Candidate of Biological Sciences, Institute of Toxicology of the Federal Medical Biological Agency of Russia;
e-mail: larkub@yandex.ru

Гайкова Ольга Николаевна, д.м.н., проф., ФГБУН «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства России»;
e-mail: olga-gaykova@yandex.ru

Olga N. Gaikova, Dr. Sci. (Med.), Prof., Institute of Toxicology of the Federal Medical Biological Agency of Russia;
e-mail: olga-gaykova@yandex.ru

Узугбунам Брайт Чуквунвике, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России;
e-mail: egbunam@yahoo.com

Brayt C. Uzuegbunam, Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical Academy;
e-mail: egbunam@yahoo.com

Модисе Кагисо, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России;
e-mail: kayg93@gmail.com

Kagiso Modise, Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical Academy;
e-mail: kayg93@gmail.com

Маквана Терри Лидия, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России;
e-mail: tlymakwana@gmail.com

Terry L. Makwana, Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical Academy;
e-mail: tlymakwana@gmail.com

Оковитый Сергей Владимирович, д.м.н., проф., ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России;
e-mail: sergey.okovity@pharminnotech.com

Sergey V. Okovityi, Dr. Sci. (Med.), Prof., Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical Academy;
e-mail: sergey.okovity@pharminnotech.com

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ПРЯМОГО ИНГИБИТОРА ТРОМБИНА СРЕДИ ЭТНИЧЕСКИХ ГРУПП РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Д.А. Сычев¹, Ш.П. Абдуллаев^{1,*}, К.Б. Мирзаев¹, К.А. Рыжикова¹, Г.Н. Шуев¹,
Е.А. Гришина¹, Ж.А. Созаева¹, С.Н. Маммаев², Д.М. Гафуров³, Е.Ю. Китаева⁴,
В.В. Шпрах⁵, С.Ш. Сулейманов⁶, Л.З. Болиева⁷, М.С.-Х. Созаева⁸, С.М. Жучкова⁹,
Н.Е. Гималдинова¹⁰, Е.Е. Сидукова¹¹, А.В. Асоскова¹, Р.Б. Мумладзе¹

¹ ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России
125993, Российская Федерация, Москва, ул. Баррикадная, д. 2/1, стр. 1

² ФГБОУ ВО «Дагестанский государственный медицинский университет» Минздрава России
367012, Российская Федерация, Республика Дагестан, Махачкала, пл. Ленина, д. 1

³ ГБУ РД «Лакская центральная районная больница»
368360, Российская Федерация, Республика Дагестан, с. Кумух, ул. Сурхайхана Первого, д. 1

⁴ ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека»
664003, Российская Федерация, Иркутск, ул. Тимирязева, д. 16

⁵ Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования — филиал ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России
664049, Российская Федерация, Иркутск, мкр Юбилейный, д. 100

⁶ Российско-японский медицинский центр «Саико»
680000, Российская Федерация, Хабаровск, ул. Комсомольская, д. 104

⁷ ФГБОУ ВО «Северо-Осетинская государственная медицинская академия» Минздрава России
362019, Российская Федерация, Республика Северная Осетия, Владикавказ, ул. Пушкинская, д. 40

⁸ ГБУЗ «Республиканская клиническая больница» Минздрава Кабардино-Балкарской Республики
360004, Российская Федерация, Кабардино-Балкарская Республика, Нальчик, ул. Ногмова, д. 91

⁹ АУ «Республиканский клинический онкологический диспансер» Минздрава Чувашии
428020, Российская Федерация, Чувашская Республика, Чебоксары, ул. Гладкова, д. 31

¹⁰ ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова»
428015, Российская Федерация, Чувашская Республика, Чебоксары, пр-т Московский, д. 15

¹¹ ГБУ Республики Марий Эл «Козьмодемьянская межрайонная больница»
425350, Российская Федерация, Республика Марий Эл, Козьмодемьянск, ул. 3-й Микрорайон, д. 25

Изучена частота носительства полиморфного маркера гена CES1 (с.1168-33A>C, rs2244613) среди представителей двенадцати этнических групп, проживающих на территории Российской Федерации. В исследовании приняли участие 1630 здоровых добровольцев. Сравнение полученных результатов с данными широкомасштабного исследования RE-LY по ассоциации носительства маркера rs2244613 с концентрацией дабигатрана и риском развития кровотечений наличие статистически значимых различий. Это обстоятельство позволяет предположить, что у пациентов, принимающих дабигатран, из числа этнических групп, проживающих на территории России, возможен более низкий риск развития кровотечений.

Ключевые слова: CES1, rs2244613, дабигатран, фармакогенетика

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: Работа выполнена при финансовой поддержке ООО «Берингер Ингельхайм».

Для цитирования: Сычев Д.А., Абдуллаев Ш.П., Мирзаев К.Б., Рыжикова К.А., Шуев Г.Н., Гришина Е.А., Созаева Ж.А., Маммаев С.Н., Гафуров Д.М., Китаева Е.Ю., Шпрах В.В., Сулейманов С.Ш., Болиева Л.З., Созаева М.С.-Х., Жучкова С.М., Гималдинова Н.Е., Сидукова Е.Е., Асоскова А.В., Мумладзе Р.Б. Генетические детерминанты безопасности применения прямого ингибитора тромбина среди этнических групп Российской Федерации. *Биомедицина*. 2019;15(1):78–94. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-1-78-94>

Поступила 17.12.2018

Принята после доработки 21.01.2019

Опубликована 10.03.2019

GENETIC DETERMINANTS OF THE SAFETY OF DABIGATRAN (CES1 GENE RS2244613 POLYMORPHISM) FOR THE RUSSIAN POPULATION: A MULTI-ETHNIC ANALYSIS

Dmitriy A. Sychev¹, Sherzod P. Abdullaev^{1,*}, Karin B. Mirzayev¹, Kristina A. Ryzhikova¹, Grigoriy N. Shuyev¹, Elena A. Grishina¹, Zhannet A. Sozaeva¹, Suleyman N. Mammaev², Daniyal M. Gafurov³, Elena Yu. Kitaeva⁴, Vladimir V. Shprakh⁵, Salavat Sh. Suleymanov⁶, Laura Z. Bolieva⁷, Mariyam S.-Kh. Sozaeva⁸, Svetlana M. Zhuchkova⁹, Natalya E. Gimaldinova¹⁰, Elena E. Sidukova¹¹, Anastasiya V. Asoskova¹, Robert B. Mumladze¹

¹ Russian Medical Academy of Continuous Professional Education
125993, Russian Federation, Moscow, Barrikadnaya str., 2/1, building 1

² Dagestan State Medical University
367000, Russian Federation, Republic of Dagestan, Makhachkala, Lenina sq., 1

³ Lak Central Regional Hospital
368360, Russian Federation, Republic of Dagestan, Kumukh, Surkhaykhana Pervogo str., 1

⁴ Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems
664003, Russian Federation, Irkutsk, Timiryazeva str., 16

⁵ Irkutsk State Medical Academy of Postgraduate Education —
branch of the Russian Medical Academy of Continuous Professional Education
664049, Russian Federation, Irkutsk, Yubileinyi microdistrict, 100

⁶ SAIKO Russian-Japanese Medical Center
680000, Russian Federation, Khabarovsk, Komsomolskaya str., 104

⁷ North Ossetian State Medical Academy
362019, Russian Federation, Republic of North Ossetia — Alania, Vladikavkaz, Pushkinskaya str., 40

⁸ Clinical Hospital of the Republic of Kabardino-Balkaria
360004, Russian Federation, Republic of Kabardino-Balkaria, Nalchik, Nogmova str., 91

⁹ Clinical Oncologic Dispensary of the Republic of Chuvashia
428020, Russian Federation, Republic of Chuvashia, Cheboksary, Gladkova str., 31

¹⁰ Chuvash State University n.a. I.N. Ulyanov
428015, Russian Federation, Republic of Chuvashia, Cheboksary, Moskovskiy ave., 15

¹¹ Kozmodemyansk Interdistrict Hospital
425350, Russian Federation, Republic of Mari El, Kozmodemyansk, 3 Mikrorayon str., 25

Dabigatran is a relatively new direct and reversible thrombin inhibitor characterized by a low molecular weight. Dabigatran is included in the latest clinical guidelines as part of anticoagulant therapy for patients with non-valvular atrial fibrillation and an involved high risk of bleeding. Dabigatran can be used in the prevention of venous thromboembolic events in patients who have undergone total knee arthroplasty. However, there is a large interindividual variability in the therapeutic effect of dabigatran,

which is reflected in its safety profile. Among the most studied genetic determinants of dabigatran safety has so far been CES1 gene SNP rs2244613. However, the racial and ethnic homogeneity among human subjects participating in NOAC clinical trials creates a problem of an adequate extrapolation of their results on the representatives of other ethnic population groups. In this regard, the aim of this study was to investigate the prevalence of the CES1 gene rs2244613 polymorphism among 12 different ethnic groups residing in Russia to provide a basis for future clinical studies concerned with the investigation of the genetic determinants of dabigatran safety.

Keywords: CES1, rs2244613, dabigatran, pharmacogenetics

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

Funding: The research was supported by the Boehringer Ingelheim International GmbH.

For citation: Sychev D.A., Abdullaev Sh.P., Mirzayev K.B., Ryzhikova K.A., Shuyev G.N., Grishina E.A., Sozaeva Zh.A., Mammaev S.N., Gafurov D.M., Kitaeva E.Yu., Shprakh V.V., Suleymanov S.Sh., Bolieva L.Z., Sozaeva M.S.-Kh., Zhuchkova S.M., Gimaldinova N.E., Sidukova E.E., Asoskova A.V., Mumladze R.B. Genetic Determinants of the Safety of Dabigatran (CES1 Gene rs2244613 Polymorphism) for the Russian Population: A Multi-Ethnic Analysis. *Biomedicine*. 2019;15(1):78–94. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-1-78-94>

Submitted 17.12.2018

Revised 21.01.2019

Published 10.03.2019

Введение

Несмотря на значительный прогресс в терапии, практике выявления факторов риска, профилактике и улучшении фармакологической помощи, группа сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) остается ведущей причиной смертности населения во всем мире. По данным ВОЗ, ежегодно от заболеваний сердечно-сосудистой системы в мире умирают около 17,5 млн человек [24]. В частности, венозные тромбозы и тромбоэмболии (ВТЭО) являются третьими по летальности среди острых кардиоваскулярных заболеваний после инфаркта миокарда (ИМ) и ишемического инсульта (ИИ) [10].

До недавнего времени основной тактикой лечения и профилактики венозных тромбозов (ВТЭ) у пациентов после операций по эндопротезированию суставов, профилактики системных тромбозов и инсультов у пациентов с ФП являлись препараты группы антагонистов витамина К (АВК). Варфарин является наиболее используемым антикоагулянтом из группы АВК, имеющим высокую доказательную базу, и входит в последние руководства по лечению и вторичной профилактике венозных тромбозов и тромбоэмболии [25]. Однако терапия

варфарином характеризуется довольно значительными ограничениями: узкий терапевтический диапазон, необходимость жесткого контроля лабораторных показателей МНО (в пределах 2–3), большое число межлекарственных взаимодействий, медленное развитие эффекта и вариабельность индивидуального ответа на лечение [5, 9].

Основными генетическими детерминантами, влияющими на фармакокинетику и фармакодинамику варфарина, являются фермент CYP2C9 и ген VKORC1 [9]. По данным множества исследований известно, что однонуклеотидные полиморфизмы генов CYP2C9 и VKORC1 обуславливают большую вариабельность дозы варфарина, что характеризуется изменением параметров безопасности препарата [5, 9]. Есть мнение, что в таком случае необходимо изменять тактику антикоагулянтной терапии и выбирать препараты из группы новых оральных антикоагулянтов (НОАК) [13].

Дабигатран — относительно новый пероральный антикоагулянт на основе низкомолекулярного прямого ингибитора тромбина. Молекула дабигатрана является полярной, поэтому для увеличения биодоступности при оральном приеме его используют

в виде пролекарства — дабигатрана этексилата (ДЭ). ДЭ обладает низкой биодоступностью в 3–7%, $T_{\max}$ составляет приблизительно 2 ч [19]. ДЭ как пролекарство подвергается метаболизму под действием карбоксилэстераз 1 и 2 (CES1, CES2). В исследовании [18] было показано, что метаболизм ДЭ в значительно большей степени зависел от активности CES1, чем от активности CES2, что позволяет рассматривать CES1 как главное звено в биотрансформации ДЭ.

Несмотря на большое количество препаратов, метаболизируемых с участием CES1, его клиническое значение недостаточно оценено. Отмечается значительная межиндивидуальная вариабельность терапевтического эффекта препаратов — субстратов CES1, что может объясняться большим количеством функционально-генетических вариантов гена CES1 [16].

Ген CES1 у человека находится в локусе 16q13-q22.1. За последнее десятилетие в базе NCBI [23] появилось огромное количество данных по однонуклеотидным полиморфизмам гена CES1. В субисследовании RE-LY [15] Pare G. и соавт. было проведено генотипирование 2944 пациентов с ФП и факторами риска развития тромбоэмболических осложнений, принимавших дабигатран. У 1490 пациентов в плазме крови была определена концентрация дабигатрана. Результаты показали, что носительство полиморфизма *c.1168-33A>C* (*rs2244613*) гена CES1 встречалось у 38,2% пациентов и было ассоциировано с более низкими значениями остаточной равновесной концентрации ($Css_{\min}$) активного метаболита дабигатрана. У гетерозигот по минорному аллелю *C* *rs2244613* значение $Css_{\min}$ было ниже на 15%, в то время как у гомозигот (CC) — на 28% по сравнению с носителями. Носительство другого полиморфизма — *c.257+885T>C* (*rs8192935*) — было ассоциировано с уменьшением пиковой равновесной концентрации ($Css_{\max}$) ак-

тивного метаболита дабигатрана на 12% ($p=3,2 \times 10^{-8}$), но не $Css_{\min}$. У носителей полиморфизма *rs2244613* отмечается тенденция к снижению риска «больших» кровотечений, носительство же *rs8192935* не влияло на риск развития кровотечений. Данные по риску кровотечений согласуются со значениями сниженной остаточной концентрации дабигатрана у носителей данного полиморфизма [15]: снижение минимальной концентрации дабигатрана на 15% соответствовало снижению на 27% относительного риска развития кровотечений, стандартизованного с учетом дозы дабигатрана, возраста, пола, оценки по шкале CHADS₂, сопутствующего применения аспирина и клиренса креатинина. При сравнении схем лечения (варфарин или дабигатран) и носительства *rs2244613* доказано статистически значимое снижение количества кровотечений у носителей *rs2244613* ($p=5,2 \times 10^{-5}$), принимавших ДЭ, по сравнению с пациентами, принимавшими варфарин, в то время как при отсутствии носительства отличий по риску кровотечения не наблюдалось ($p=0,65$). Следует отметить, что носительство *rs2244613* не влияло на основной показатель эффективности — частоту развития ИИ или эмболии в сосудах большого круга кровообращения ($p=0,34$) [15].

В другом исследовании [8] изучалось влияние полиморфизмов *rs2244613* и *rs8192935* гена CES1 на фармакокинетику ДЭ, участвовало 92 пациента с ФП европейской расы, итальянской этнической группы. Результаты выявили, снижение $Css_{\min}$ дабигатрана по полиморфизму *rs8192935* на 3% у гетерозигот (CT) ($p=0,055$) и на 11% — у гомозигот (TT) ($p=0,033$).

Полиморфизм *c.428G>A* (*rs71647871*) кодирует фермент со сниженной функциональной активностью [18]. Данный аллельный вариант характеризуется снижением образования активного метаболита дабигатрана в клетках печени в условиях *in vitro*. Однако никаких полноценных

исследований с участием пациентов, принимающих ДЭ, по данному полиморфизму не проводилось. В этом же исследовании [18] Shi J. и соавт. не обнаружили никаких значимых ассоциаций между *rs2244613* и *rs8192935*, экспрессией CES1 и активностью метаболизма ДЭ. Авторы отмечают необходимость продолжения изучения влияния носительства вышеупомянутых полиморфизмов на функцию CES1 и метаболизм ДЭ.

Приведенные работы подчеркивают потенциальную перспективность фармакогенетических исследований при персонализации антикоагулянтной терапии и выборе НОАК, таких как дабигатран. Однако нынешняя ситуация расовой и этнической однородности участников клинических исследований НОАК [12] создает проблему адекватной экстраполяции результатов таких исследований на представителей других народов и этносов.

На настоящий момент наиболее изученной генетической детерминантой безопасности дабигатрана является полиморфизм *rs2244613* гена CES1. Возможным применением результатов фармакогенетических исследований по данному полиморфизму является выбор тактики антикоагулянтной терапии пациентов с неклапанной ФП с высоким риском развития кровотечений и для

профилактики ВТЭО у пациентов после операций по эндопротезированию суставов. Другая проблема — большая часть фармакогенетических исследований по дабигатрану в целом и по интересующему нас полиморфизму *rs2244613* в частности проводилась с участием пациентов европеоидной расы (см. табл. 1). Перечисленные аспекты особенно актуальны для такой многонациональной страны, как Россия, и таких ее регионов, как Кавказ, Поволжье, Сибирь и Дальний Восток.

Таким образом, главной **целью** данного **исследования** являлось изучение распространенности генетической детерминанты безопасности дабигатрана — полиморфизма *rs2244613* гена CES1 — среди представителей разных этносов, проживающих на территории Российской Федерации.

Материалы и методы

Исучаемая популяция. В исследовании приняли участие 1630 условно здоровых добровольцев (мужчин и женщин) из разных этнических групп, проживающих на территории Российской Федерации: 136 из русской этнической группы (г. Иркутск), 90 аварцев, 50 даргинцев и 46 лакцев, 112 балкарцев, 120 кабардинцев, 244 осетина, 206 марийцев, 204 мордвы, 238 чувашей, 114 бурятов и 70 нанайцев.

Таблица 1. Частота генотипов и аллелей по *rs2244613* среди участников фармакогенетических исследований в ранее опубликованных работах

Table 1. Frequency of genotypes and alleles at *rs2244613* among the participants of pharmacogenetic studies in previously published works

Расовая (этническая принадлежность)	Заболевание	N	Генотип, %			Частота аллелей, %		Исследование
			AA	AC	CC	A	C	
Европеоидная	НФП	1490	67,2	29,4	3,4	81,9	18,1	RE-LY [15]
Европеоидная (итальянцы)	НФП	90	57,6	40,2	2,2	77,7	22,3	Dimatteo et al. [8]
Европеоидная (новозеландцы)	НФП	52	73,1	23,1	3,8	84,7	15,3	Chin et al. [7]

Примечание: НФП — неклапанная фибрилляция предсердий.

Note: НФП (Rus.) is non-valvular atrial fibrillation.

Все участники дали свое добровольное информированное согласие на участие в исследовании и на забор и сохранение генетического материала.

Популяция сравнения. Распространенность полиморфного маркера *rs2244613* гена *CES1* среди изучаемых групп сравнивали между собой и с аналогичными показателями популяции европеоидов, принимавших участие в исследовании RE-LY [15] как наиболее полной работы по фармакогенетическому изучению *rs2244613*.

Критерии включения: этническая принадлежность определялась путем самоидентификации участников и их родителей. Как показано в ранее проведенных исследованиях, отмечается высокая корреляция между использованным методом самоидентификации и определением микросателлитных маркеров этнической принадлежности [20].

Критерии не включения: в исследование не включали потомков разноэтнических браков.

Генотипирование. Материалом для определения полиморфизмов послужили 4 мл крови из вен локтевого сгиба, собранной с помощью вакуумной системы для взятия венозной крови VACUETTE (Greiner Bio-One, Австрия) в пробирки с ЭДТА. Выделение ДНК осуществляли с помощью набора реагентов «ДНК-Экстран-1» для выделения геномной ДНК из цельной крови (ЗАО «Синтол», Москва, Россия). Носительство полиморфного маркера *rs2244613* гена *CES1* выявлялось методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (Real-Time PCR) с помощью наборов реагентов «ГенТест *CES1*» (ООО «Номотек», Москва, Россия) на амплификаторе Real-Time CFX96 Touch (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA). Программа амплификации включала предварительную инкубацию при 95°C в течение 3 мин, затем в течение 50 циклов денатурация при 95°C — 10 с и отжиг при 60°C — 30 с.

Статистический анализ. Оценивалось соответствие независимому распределению аллелей по закону Харди — Вайнберга с использованием критерия Хи-квадрат Пирсона. Для оценки различий частот встречаемости различных аллелей между группами использовали точный тест Фишера. Для всех показателей статистически значимым считали значение $p < 0,05$. В качестве средств статистической обработки применялся пакет программ IBM SPSS Statistics 22, GraphPad InStat.

Результаты исследований

Результаты генотипирования участников по частоте генотипов и носительству минорного аллеля полиморфизма *rs2244613* представлены в табл. 2.

Соответствие равновесному распределению частот генотипов согласно закону Харди — Вайнберга ($p > 0,05$) наблюдалось во всех изучаемых нами этнических группах, кроме нанайцев.

До этого распространенность данной мутации гена *CES1* не была изучена в популяциях, относящихся к различным этносам. Нами впервые было проведено широкомасштабное исследование по определению частоты носительства полиморфизма *rs2244613* гена *CES1* среди представителей разных этнических групп, населяющих Российскую Федерацию.

Русский этнос является самым многочисленным на территории России, и поэтому именно с ним мы сравнивали результаты генотипирования остальных этнических групп в первую очередь. Для полноты анализа мы провели сравнение частоты аллелей попарно между собой во всех группах (табл. 3).

При генотипировании условно здоровых участников из русской этнической группы у 70 (51,5%) установлен генотип *AA*, у 55 (40,4%) — генотип *AC* и у 11 (8,1%) — генотип *CC*. Частота минорного аллеля составила 28,3%.

Таблица 2. Частота распределения генотипов и соответствие закону Харди — Вайнберга
Table 2. Frequency of the distribution of genotypes and compliance with the Hardy — Weinberg principle

Этническая группа	N	Частота	Генотип			Частота минорного аллеля С, %	Соответствие распределению по закону Харди — Вайнберга	
			АА	АС	СС		χ^2	p
Русские	136	набл.	70	55	11	28,3	0,0018	0,999
		ожд.	69,9	55,2	10,9			
		%	51,5	40,4	8,1			
КАВКАЗ								
Аварцы	90	набл.	34	43	13	38,3	0,008	0,996
		ожд.	34,2	42,6	13,2			
		%	37,8	47,8	14,4			
Даргинцы	50	набл.	18	24	8	40,0	3,944* 10 ⁻³¹	1
		ожд.	18,0	24,0	8,0			
		%	36,0	48,0	16,0			
Лакцы	46	набл.	24	17	5	29,3	0,504	0,777
		ожд.	23,0	19,1	4,0			
		%	52,2	37,0	10,9			
Кабардинцы	120	набл.	40	64	16	40,0	1,304	0,521
		ожд.	43,2	57,6	19,2			
		%	33,3	53,3	13,3			
Балкарцы	112	набл.	48	54	10	33,0	0,733	0,693
		ожд.	50,2	49,6	12,2			
		%	42,9	48,2	8,9			
Осетины	244	набл.	134	87	23	27,3	2,614	0,2707
		ожд.	129,1	96,8	18,1			
		%	54,9	35,7	9,4			
ПОВОЛЖЬЕ								
Марийцы	206	набл.	75	96	35	40,3	0,226	0,8933
		ожд.	73,4	99,1	33,4			
		%	36,4	46,6	17,0			
Мордва	204	набл.	113	78	13	25,5	0,022	0,9892
		ожд.	113,3	77,5	13,3			
		%	55,4	38,2	6,4			
Чуваши	238	набл.	97	104	37	37,4	1,228	0,5411
		ожд.	93,3	111,4	33,3			
		%	40,8	43,7	15,5			
СИБИРЬ и ДАЛЬНИЙ ВОСТОК								
Буряты	114	набл.	17	52	45	62,3	0,159	0,9234
		ожд.	16,2	53,6	44,2			
		%	14,9	45,6	39,5			

Продолжение таблицы 2

Нанайцы	70	набл.	3	40	27	67,1	6,254	0,0438
		ожд.	7,56	30,89	31,56			
		%	4,3	57,1	38,6			

Примечание: набл. — наблюдаемая частота генотипов, ожд. — ожидаемая частота генотипов, χ^2 — значение хи-квадрата Пирсона.

Note: набл. (Rus.) is the observed frequency of genotypes, ожд. (Rus.) is the expected frequency of genotypes, χ^2 is the value of Pearson's chi-squared test.

В отличие от русского этноса, проживающего относительно равномерно по всей территории России, народы северокавказского региона отличается более компактная область проживания. Северный Кавказ является прекрасным примером изучения влияния географического фактора на генетическую структуру населения [21]. Религиозная разобщенность, отсутствие lingua franca определяют и генетическую изолированность кавказских этносов.

В Дагестане, северо-восточном кавказском регионе России, проживает 26 из 50 автохтонных кавказских этнических групп, характеризующихся большими генетическими различиями между отдельными популяциями проживающих на относительно маленькой территории [14]. Однако сравнение частоты носительства изучаемого полиморфизма в трех этнических группах Дагестана (аварцы, даргинцы, лакцы) не выявило статистически значимых различий по распространенности маркера *rs2244613* между группами ($p>0,05$). В то же время при сравнении с русской группой выявлены различия между аварцами и русскими ($p=0,0309$), даргинцами и русскими ($p=0,0332$). Частота данного аллельного варианта среди аварцев (38,3%) и даргинцев (40,0%) была выше, чем частота среди русских (28,3%). Различий в частоте носительства *rs2244613* между русскими и лакцами не обнаружено.

Кабардинцы — народ, относящийся к абхазо-адыгской языковой группе, — составляют большинство населения Кабар-

дино-Балкарской Республики. Вторым по численности этносом республики являются балкарцы, тюркоязычный народ алтайской языковой семьи. Языковая разобщенность кабардинцев и балкарцев обуславливает незначительное смешение и относительную генетическую изолированность народов. Следует отметить, что, несмотря на принадлежность к разным языковым и этническим группам, между кабардинцами и балкарцами не выявлено статистически значимых различий в частоте носительства маркера *rs2244613* ($p>0,05$). Сравнение с русскими показало наличие различий только с кабардинцами ($p=0,0066$). Частота носительства минорного аллеля *C* у кабардинцев составила 40,0% против 28,3% у русских.

Следующей этнической группой, включенной в наше исследование, являются осетины — народ, проживающий на северном и южном склоне Большого Кавказского хребта. В группе осетин частота носительства минорного аллеля не различалась в сравнении с русской этнической группой ($p>0,05$). Но сравнение частоты распространенности *rs2244613* с изучаемыми кавказскими этносами выявило наличие статистически значимых различий с аварцами ($p=0,0077$), даргинцами ($p=0,0156$) и кабардинцами ($p=0,0007$) — так же, как и у русских. Частота минорного аллеля была примерно одинаковой с русскими — 27,3%, но ниже, чем у аварцев, даргинцев и кабардинцев (табл. 2).

Другим этнически многообразным регионом России является Поволжье. Здесь на

Таблица 3. Парное сравнение частоты аллелей полиморфизма rs2244613 гена CEST в двенадцати изучаемых популяциях и результатов исследования RE-LY [15] (p-value)

Table 3. Pair comparison of the allele frequency at the rs2244613 polymorphism of the CEST gene in 12 studied populations and the results of the RE-LY study [15] (p-value)

Этническая группа	Русские	Аварцы	Даргинцы	Лакцы	Кабардинцы	Балкарцы	Осетины	Марийцы	Мордва	Чуваши	Буряты	Нанайцы
Русские	-	0,0309	0,0332	0,8940	0,0066	0,2811	0,7997	0,0014	0,4264	0,0129	<0,0001	<0,0001
Аварцы	-	-	0,7992	0,1798	0,7625	0,2957	0,0077	0,7150	0,0023	0,8568	<0,0001	<0,0001
Даргинцы	-	-	-	0,1322	1,0000	0,2573	0,0156	1,0000	0,0062	0,6509	0,0003	<0,0001
Лакцы	-	-	-	-	0,0767	0,5958	0,7034	0,0577	0,4346	0,1557	<0,0001	<0,0001
Кабардинцы	-	-	-	-	-	0,1241	0,0007	1,0000	0,0001	0,5153	<0,0001	<0,0001
Балкарцы	-	-	-	-	-	-	0,1308	0,0729	0,0521	0,2736	<0,0001	<0,0001
Осетины	-	-	-	-	-	-	-	<0,0001	0,5946	0,0009	<0,0001	<0,0001
Марийцы	-	-	-	-	-	-	-	-	<0,0001	0,4073	<0,0001	<0,0001
Мордва	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0002	<0,0001	<0,0001
Чуваши	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<0,0001	<0,0001
Буряты	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3717
Нанайцы	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Результаты сравнения с участниками исследования RE-LY												
RE-LY	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0094	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0005	<0,0001	<0,0001	<0,0001

территории бассейнов рек Волга и Кама уживаются народы тюркской и финно-угорской языковых групп, преимущественно относящихся к европеоидной расе. При сравнении частоты носительства аллелей у русских с марийцами, мордвой и чувашами статистически значимые различия выявлены в этнических группах марийцев ($p=0,0014$) и чувашей ($p=0,0129$): частота аллеля *C* у марийцев и чувашей выше, чем у русских, и составляет 40,3 и 37,4% соответственно. Сравнение частоты минорного аллеля *C* среди представителей народов Поволжья между собой выявило наличие различий между мордвой с марийцами ($p<0,0001$) и с чувашами ($p=0,0002$) — также как у русских. Мордву отличает более низкий процент носительства маркера *rs2244613* — 25,5%, что близко к частоте среди русских (табл. 2).

Сравнение частоты носительства маркера среди этнических групп поволжского региона и Кавказа показало наличие различий у марийцев и чувашей только в сравнении с осетинами ($p<0,0001$ и $p=0,0009$ соответственно), тогда как среди мордовцев статистически значимые различия наблюдались с аварцами ($p=0,0023$), даргинцами ($p=0,0062$) и кабардинцами ($p=0,0001$).

Сибирь и Дальний Восток обладают уникальной этнической гетерогенностью популяций. Несоразмерное распределение малых популяций на обширной территории этих регионов при средней плотности населения около 3 человек на 1 км² приводит к тому, что некоторые автохтонные группы остаются антропологически, лингвистически и генетически отличными друг от друга. Буряты — коренной народ Республики Бурятия, находящейся на юге Сибири, нанайцы — коренной малочисленный народ регионов Дальнего Востока. Оба этноса относятся к монголоидам. Сравнение носительства аллелей *rs2244613* показало наличие статистически значимых различий между бурятами и нанайцами со

всеми сравниваемыми этническими группами ($p<0,0001$) (табл. 3) и отсутствие таковых при сравнении между собой. Высокая частота встречаемости *C* аллели (62,3% у бурятов и 67,1% у нанайцев) по сравнению с остальными этническими группами говорит о значительном отличии монголоидной расы от европеоидной по частоте носительства данного полиморфизма. Схожие показатели относительно частоты носительства минорного аллеля *C* по *rs2244613* у монголоидов (китайцев) были отмечены в работе [11] — 60%.

Для формирования обобщенных выводов по результатам исследования мы сравнили частоты распространенности аллелей *rs2244613* среди изучаемых этнических групп с европеоидами из работы RE-LY (см. табл. 3). Во всех группах были обнаружены статистически значимые различия ($p<0,05$), что требует особого внимания, учитывая большую разницу в частоте носительства минорного аллеля *C* среди европеоидов RE-LY по сравнению с европеоидами России (от 22,5% у мордвы до 40,3% у марийцев). У русских частота минорного аллеля составляла 28,3%, что в 1,5 раза выше, чем у участников RE-LY. У бурят и нанайцев эта разница составила 3,5 раза: 62,3 и 67,1% против 18,3%.

Обсуждение результатов

Несмотря на прогресс в фармакогенетических исследованиях и растущее количество примеров внедрения принципов фармакогенетики в рутинную клиническую практику стран Европы и США, остается нерешенным вопрос адекватности применения результатов таких исследований в популяциях, отличных от европейской и американской. Это ключевой момент, поскольку сообщаемая частота аллелей и генотипов для одной популяции может быть неприменима для другой [2].

Этническая чувствительность к лекарственным препаратам ассоциирована

с генетическими особенностями ферментов биотрансформации препаратов [12]. Так, печеночный фермент CYP2C19 способствует метаболизму большого количества клинически значимых препаратов (бензодиазепины, некоторые ингибиторы протонной помпы, клопидогрел). Ген CYP2C19, как и многие другие члены надсемейства P450, является высокополиморфным, имеет более 25 известных вариантов аллелей и характеризуется высокой этнической гетерогенностью [1, 14]. Ярким примером межэтнических различий в распространенности генов, определяющих чувствительность организма на воздействие лекарственных препаратов, в частности варфарина, является ген CYP2C9 [4, 13, 14]. Аллельные варианты CYP2C9*2 и CYP2C9*3 могут являться маркерами предрасположенности к сниженной функциональной активности этих изоферментов и повышенной концентрации варфарина, что увеличивает риск кровотечений и гипокоагуляции у представителей отдельных этносов [5]. Эти выводы свидетельствуют о перспективности внедрения фармакогенетического тестирования как нового инструмента повышения эффективности и безопасности фармакотерапии в рамках принципов персонализированной медицины.

Учитывая наличие генетических различий между расами и этносами по ферментам семейства P450, ответственных за метаболизм различных препаратов, разумно предположить наличие таковых и для группы ферментов, метаболизирующих НОАК, в частности дабигатрана. Данные ресурса www.pharmgkb.org подтверждают этот аргумент [22].

Дабигатран является одной из альтернатив варфарину в профилактике инсультов и системных тромбозов у пациентов с неклапанной ФП. Более благоприятный профиль межлекарственного взаимодействия, широкое значение терапевтического окна, фиксированные дозировки отменя-

ют необходимость мониторинга МНО, что выгодно отличает дабигатран от традиционных антикоагулянтов из группы АВК. Однако остаются нерешенными вопросы межиндивидуальной вариабельности концентрации дабигатрана и связанные с этим риски геморрагических осложнений.

Полиморфизм гена *CES1 rs2244613* может влиять на биотрансформацию ДЭ и, соответственно, на концентрацию дабигатрана [6, 8, 15], что, в свою очередь, может определять профиль безопасности. Имеются работы, в которых отмечается корреляция между плазменной концентрацией дабигатрана и антикоагуляционным эффектом, а также связанные с этим риски развития инсульта и кровотечений [17].

Исследования по ассоциации *rs2244613* гена *CES1* с концентрацией дабигатрана и риском развития сердечно-сосудистых осложнений показывают, что пациенты — носители минорного аллеля *C* по данному полиморфизму имеют более низкий риск развития кровотечений. Предполагается, что данный полиморфизм играет ключевую роль в межиндивидуальных изменениях концентрации активного метаболита в крови и, возможно, обуславливает наличие этнических различий в чувствительности к дабигатрану. Это предположение может служить основой создания региональных формуляров по фармакотерапии с учетом национального состава. Подобные исследования особенно актуальны для России с ее регионами компактного проживания различных расово-этнических групп, в частности регионов Кавказа, Поволжья, Сибири и Дальнего Востока.

Закключение

Наши результаты ярко иллюстрируют генетическую гетерогенность популяций разных этнических групп по *rs2244613* в России. Сравнение полученных нами результатов с данными широкомасштабного исследования RE-LY по ассоциации носи-

тельства маркера *rs2244613* с концентрацией дабигатрана и риском развития кровотечений в популяции европеоидов показало наличие статистически значимых различий ($p < 0,05$).

В работе [3] было показано, что полиморфизм *rs2244613* одинаково часто встречается как у здоровых, так и у больных ССЗ. Это говорит об отсутствии связи полиморфизма с заболеванием и возможности экстраполяции результатов и выводов исследования между группами.

Исходя из полученных нами результатов, факта об отсутствии различий по частоте носительства *rs2244613* между здоровыми людьми и пациентами с ССЗ [3] и выводов исследования RE-LY, мы можем

предположить, что у пациентов, принимающих дабигатран, из числа этнических групп, проживающих на территории России, возможен более низкий риск развития кровотечений (как побочный эффект дабигатрана).

Однако для более полного понимания взаимосвязи носительства полиморфного маркера *rs2244613* и клинических исходов фармакотерапии, персонализации режимов дозирования для пациентов, принимающих дабигатран, необходимо проведение дальнейших проспективных фармакогенетических исследований с параллельным анализом фармакокинетических и клинических особенностей препарата у разных этнических групп.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Голухова Е.З., Григорян М.В., Рябинина М.Н. Современные аспекты фармакогенетики клопидогреля и его клиническое значение // Креативная кардиология. — 2014. — № 3. — С. 39–52.
2. Каркищенко Н.Н. Мимикрии фармакогенополиморфизма // В кн.: Альтернативы биомедицины. Том 2. Классика и альтернативы фармакотоксикологии. — М.: ВПКС, 2007. — С. 111–158.
3. Мирзаев К.Б., Осипова Д.В., Китаева Е.Ю., Шпрах В.В., Абдуллаев Ш.П., Андреев Д.А., Сычев Д.А. Влияния полиморфизма гена *CES1* на антиагрегантный эффект блокатора *P2Y12* рецепторов клопидогреля // Клиническая фармакология и терапия. — 2018. — Т. 27. — № 5. — С. 96–100.
4. Ромодановский Д.П., Хапаев Б.А., Игнатьев И.В., Кукес В.Г., Каркищенко В.Н. Частоты «медленных» аллельных вариантов генов, кодирующих изоферменты цитохрома *P450 CYP2D6*, *CYP2C19*, *CYP2C9*, у карачаевцев и черкесов // Биомедицина. — 2010. — № 2. — С. 33–37.
5. Сычев Д.А., Казаков Д.А., Отделенов В.А., Прокофьев А.Б. Прикладные аспекты применения фармакогенетического тестирования для персонализации применения пероральных антикоагулянтов в российских условиях. Рациональная фармакотерапия в кардиологии. — 2013. — Т. 9. — № 5 — С. 525–531.
6. Сычев Д.А., Леванов А.Н., Шелехова Т.В., Бочков П.О., Денисенко Н.П., Рыжикова К.А., Мирзаев К.Б., Гришина Е.А., Гаврилов М.А. Влияние полиморфизма генов *ABCB1* и *CES1* на уровни равновесных концентраций дабигатрана у пациентов после эндопротезирования коленного сустава // Атеротромбоз. — 2018 — № 1. — С. 122–130.
7. Chin P.K., Wright D.F., Zhang M., Wallace M.C., Roberts R.L., Patterson D.M., Jensen B.P., Barclay M.L., Begg E.J. Correlation between trough plasma dabigatran concentrations and estimates of glomerular filtration rate based on creatinine and cystatin C // *Drugs R. D.* — 2014. — V. 14, No. 2. — Pp. 113–123.
8. Dimatteo C., D'Andrea G., Vecchione G., Paoletti O., Cappucci F., Tiscia G.L., Buono M., Grandone E., Testa S., Margaglione M. Pharmacogenetics of dabigatran etexilate interindividual variability // *Thromb. Res.* — 2016. — No. 144. — Pp. 1–5.
9. Eriksson N., Wadelius M. Prediction of warfarin dose: why, when and how? // *Pharmacogenomics.* — 2012. — No. 13(4). — Pp. 429–440.
10. Goldhaber S.Z., Bounameaux H. Pulmonary embolism and deep vein thrombosis // *Lancet.* — 2012. — No. 379(9828). — Pp. 1835–1846.
11. Gu Z.C., Ma X.W., Zheng X.Y., Shen L., Shi F.H., Li H. Left atrial appendage thrombus formation in a patient on dabigatran therapy associated with *ABCB1* and *CES-1* genetic defect // *Front. Pharmacol.* — 2018. — No. 9. — P. 491.
12. Jackson L.R. 2nd, Peterson E.D., Okeagu E., Thomas K. Review of race/ethnicity in non-vitamin K antagonist oral anticoagulants clinical trials // *J. Thromb. Thrombolysis.* — 2015. — V. 39, No. 2. — Pp. 222–227.
13. Mazur-Bialy A.I., Zdebska K., Wypasek E., Undas A. Repeated bleeding complications during therapy with vitamin K antagonists in a patient with the *VKORC1*2A*

- and the CYP2C9*3/*3 alleles: genetic testing to support switching to new oral anticoagulants // *Thromb. Res.* — 2013. — No. 131(3). — Pp. 279–280.
14. Mirzaev K.B., Sychev D.A., Ryzhikova K.A., Konova O.D., Mammaev S.N., Gafurov D.M., Shuev G.N., Grishina E.A., Sozaeva Z.A. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 enzymes and transport proteins in a Russian population and three ethnic groups of Dagestan // *Genet. Test. Mol. Biomarkers.* — 2017. — V. 21, No. 12. — Pp. 747–753.
 15. Pare G., Eriksson N., Lehr T., Connolly S., Eikelboom J., Ezekowitz M.D., Axelsson T., Haertter S., Oldgren J., Reilly P., Siegbahn A., Syvanen A.C., Wadelius C., Wadelius M., Zimdahl-Gelling H., Yusuf S., Wallentin L. Genetic determinants of dabigatran plasma levels and their relation to bleeding // *Circulation.* — 2013. — No. 127. — Pp. 1404–1412.
 16. Rasmussen H.B., Bjerre D., Linnet K., Jürgens G., Dalhoff K., Stefansson H., Hankemeier T., Kaddurah-Daouk R., Taboureaux O., Brunak S., Houmann T., Jeppesen P., Pagsberg A.K., Plessen K., Dyrborg J., Hansen P.R., Hansen P.E., Hughes T., Werge T. Individualization of treatments with drugs metabolized by CES1: combining genetics and metabolomics // *Pharmacogenomics.* — 2015. — V. 16, No. 6. — Pp. 649–665.
 17. Reilly P.A., Lehr T., Haertter S., Connolly S.J., Yusuf S., Eikelboom J.W., Ezekowitz M.D., Nehmiz G., Wang S., Wallentin L.; RE-LY Investigators. The effect of dabigatran plasma concentrations and patient characteristics on the frequency of ischemic stroke and major bleeding in atrial fibrillation patients: the RE-LY Trial (Randomized Evaluation of Long-Term Anticoagulation Therapy) // *J. Am. Coll. Cardiol.* — 2014. — No. 63. — Pp. 321–328.
 18. Shi J., Wang X., Nguyen J.H., Bleske B.E., Liang Y., Liu L., Zhu H.J. Dabigatran etexilate activation is affected by the CES1 genetic polymorphism G143E (rs71647871) and gender // *Biochem. Pharmacol.* — 2016. — No. 119. — Pp. 76–84.
 19. Stangier J., Eriksson B.I., Dahl O.E., Ahnfelt L., Nehmiz G., Stahle H., Rathgen K., Svård R. Pharmacokinetic profile of the oral direct thrombin inhibitor dabigatran etexilate in healthy volunteers and patients undergoing total hip replacement // *J. Clin. Pharmacol.* — 2005. — No. 45. — Pp. 555–563.
 20. Tang H., Quertermous T., Rodriguez B., Kardias S.L., Zhu X., Brown A., Pankow J.S., Province M.A., Hunt S.C., Boerwinkle E., Schork N.J., Risch N.J. Genetic structure, self-identified race/ethnicity, and confounding in case-control association studies // *Am. J. Hum. Genet.* — 2005. — V. 76, No. 2. — Pp. 268–275.
 21. Yunusbayev B., Kutuev I., Khusainova R., Guseinov G., Khusnutdinova E. Genetic structure of Dagestan populations: a study of 11 Alu insertion polymorphisms // *Hum. Biol.* — 2006. — V. 78, No. 4. — Pp. 465–476.
 22. <https://www.pharmgkb.org/variant/PA166155037/overview>
 23. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=CES1>
 24. http://www.who.int/cardiovascular_diseases/ru
 25. <http://hdl.handle.net/2268/205593>

REFERENCES

1. Golukhova E.Zh., Grigoryan M.V., Ryabinina M.N. Sovremennyye aspekty farmakogenetiki klopidogetrel i yego klinicheskoye znachenie [Current aspects of clopidogrel pharmacogenetics and its clinical significance]. *Creative Cardiology.* 2014. No. 13. Pp. 39–52. (In Russian).
2. Karkischenko N.N. Mimikrii farmakogenopolimorfizma [Pharmacogenopolymorphism mimicry] // V kn.: *Alternativy biomeditsiny. Vol. 2. Klassika i alternativy farmakotoksikologii.* [In the book: Biomedicine alternatives. Part 2. Classical and Alternative Pharmacotoxicology]. Moscow: VPK. 2007. Pp. 111–158. (In Russian).
3. Mirzaev K.B., Osipova D.V., Kitaeva E.Yu., Shprakh V.V., Abdullaev Sh.P., Andreev D.A., Sychev D.A. Vliyaniye polimorfizma gena CES1 na antiagregiruyemyy effekt blokatora P2Y12 retseptorov klopidogetrel. [CES1 gene polymorphism effect on the antiplatelet activity of clopidogrel]. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2018. Vol. 27. No. 5. Pp. 96–100. (In Russian).
4. Romodanovsky D.P., Khapaev B.A., Ignatiev I.V., Kukes V.G., Karkischenko V.N. Chastoty «medlennykh» allel'nykh variantov genov, kodiruyushchikh izofermenty tsitokhroma P450 CYP2D6, CYP2C19, CYP2C9 u karachayevtsev i cherkesov [Frequencies of the «slow» allele variants of the genes coding isoenzymes of cytochrome P450 CYP2D6, CYP2C19, CYP2C9 in Karachayevs and Circassians]. *Biomedicine.* 2010. No. 2. Pp. 33–37. (In Russian).
5. Sychev D.A., Kazakov R.E., Otdelenov V.A., Prokofiev A.B. Prikladnyye aspekty primeneniya farmakogeneticheskogo testirovaniya dlya personalizatsii primeneniya peroralnykh antikoagulyantov v rossiyskikh usloviyakh [Applications of pharmacogenetic testing for personalization of therapy with oral anticoagulants in Russia]. *Ration Pharmacother. Cardiol.* 2013. No. 9(5). Pp. 525–531. (In Russian).
6. Sychev D.A., Levanov A.N., Shelekhova T.V., Bochkov P.O., Denisenko N.P., Ryzhikova K.A., Mirzaev K.B., Grishina E.A., Gavrilov M.A. Impact of ABCB1 and CES1 genetic polymorphisms on trough steady-state dabigatran concentrations in patients after endoprosthesis of knee joint. *Atherothrombosis Journal.* 2018. No. 1. Pp. 122–130. (In Russian).
7. Chin P.K., Wright D.F., Zhang M., Wallace M.C., Roberts R.L., Patterson D.M., Jensen B.P., Barclay M.L., Begg E.J. Correlation between trough plasma dabigatran concentrations and estimates of glomerular

- filtration rate based on creatinine and cystatin C. *Drugs* R. D. 2014. V.14. No. 2. Pp.113–123.
8. Dimatteo C., D'Andrea G., Vecchione G., Paoletti O., Cappucci F., Tiscia G.L., Buono M., Grandone E., Testa S., Margaglione M. Pharmacogenetics of dabigatran etexilate interindividual variability. *Thromb. Res.* 2016. No. 144. Pp. 1–5.
 9. Eriksson N., Wadelius M. Prediction of warfarin dose: why, when and how? *Pharmacogenomics*. 2012. No. 13(4). Pp. 429–440.
 10. Goldhaber S.Z., Bounameaux H. Pulmonary embolism and deep vein thrombosis. *Lancet*. 2012. No. 379(9828). Pp. 1835–1846.
 11. Gu Z.C., Ma X.W., Zheng X.Y., Shen L., Shi F.H., Li H. Left atrial appendage thrombus formation in a patient on dabigatran therapy associated with ABCB1 and CES-1 genetic defect. *Front. Pharmacol.* 2018. No. 9. P. 491.
 12. Jackson L.R. 2nd, Peterson E.D., Okeagu E., Thomas K. Review of race/ethnicity in non-vitamin K antagonist oral anticoagulants clinical trials. *J. Thromb. Thrombolysis*. 2015. V. 39. No. 2. Pp. 222–227.
 13. Mazur-Bialy A.I., Zdebska K., Wypasek E., Undas A. Repeated bleeding complications during therapy with vitamin K antagonists in a patient with the VKORC1*2A and the CYP2C9*3/*3 alleles: genetic testing to support switching to new oral anticoagulants. *Thromb. Res.* 2013. No. 131(3). Pp. 279–280.
 14. Mirzaev K.B., Sychev D.A., Ryzhikova K.A., Konova O.D., Mammaev S.N., Gafurov D.M., Shuev G.N., Grishina E.A., Sozaeva Z.A. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 enzymes and transport proteins in a Russian population and three ethnic groups of Dagestan. *Genet. Test. Mol. Biomarkers*. 2017. V. 21. No. 12. Pp. 747–753.
 15. Pare G., Eriksson N., Lehr T., Connolly S., Eikelboom J., Ezekowitz M.D., Axelsson T., Haertter S., Oldgren J., Reilly P., Siegbahn A., Syvanen A.C., Wadelius C., Wadelius M., Zimdahl-Gelling H., Yusuf S., Wallentin L. Genetic determinants of dabigatran plasma levels and their relation to bleeding. *Circulation*. 2013. No. 127. Pp. 1404–1412.
 16. Rasmussen H.B., Bjerre D., Linnet K., Jürgens G., Dalhoff K., Stefansson H., Hankemeier T., Kaddurah-Daouk R., Taboureaux O., Brunak S., Houmann T., Jeppesen P., Pagsberg A.K., Plessen K., Dyrborg J., Hansen P.R., Hansen P.E., Hughes T., Werge T. Individualization of treatments with drugs metabolized by CES1: combining genetics and metabolomics. *Pharmacogenomics*. 2015. V. 16. No. 6. Pp. 649–665.
 17. Reilly P.A., Lehr T., Haertter S., Connolly S.J., Yusuf S., Eikelboom J.W., Ezekowitz M.D., Nehmiz G., Wang S., Wallentin L.; RE-LY Investigators. The effect of dabigatran plasma concentrations and patient characteristics on the frequency of ischemic stroke and major bleeding in atrial fibrillation patients: the RE-LY Trial (Randomized Evaluation of Long-Term Anticoagulation Therapy). *J. Am. Coll. Cardiol.* 2014. No. 63. Pp. 321–328.
 18. Shi J., Wang X., Nguyen J.H., Bleske B.E., Liang Y., Liu L., Zhu H.J. Dabigatran etexilate activation is affected by the CES1 genetic polymorphism G143E (rs71647871) and gender. *Biochem. Pharmacol.* 2016. No. 119. Pp. 76–84.
 19. Stangier J., Eriksson B.I., Dahl O.E., Ahnfelt L., Nehmiz G., Stahle H., Rathgen K., Svärd R. Pharmacokinetic profile of the oral direct thrombin inhibitor dabigatran etexilate in healthy volunteers and patients undergoing total hip replacement. *J. Clin. Pharmacol.* 2005. No. 45. Pp. 555–563.
 20. Tang H., Quertermous T., Rodriguez B., Kardia S.L., Zhu X., Brown A., Pankow J.S., Province M.A., Hunt S.C., Boerwinkle E., Schork N.J., Risch N.J. Genetic structure, self-identified race/ethnicity, and confounding in case-control association studies. *Am. J. Hum. Genet.* 2005. V. 76. No. 2. Pp. 268–275.
 21. Yunusbayev B., Kutuev I., Khusainova R., Guseinov G., Khusnutdinova E. Genetic structure of Dagestan populations: a study of 11 Alu insertion polymorphisms. *Hum. Biol.* 2006. V. 78. No. 4. Pp. 465–476.
 22. <https://www.pharmgkb.org/variant/PA166155037/overview>
 23. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=CES1>
 24. http://www.who.int/cardiovascular_diseases/ru
 25. <http://hdl.handle.net/2268/205593>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Сычев Дмитрий Алексеевич, д.м.н., проф., член-корр. РАН, проф. РАН, ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России;
e-mail: dmitry.alex.sychev@gmail.com

Dmitriy A. Sychev, Dr. Sci. (Med.), Professor, Corresponding Member of RAS, Professor of RAS, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education;
e-mail: dmitry.alex.sychev@gmail.com

Абдуллаев Шерзод Пардабоевич*, ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России;
e-mail: sherzodx5@gmail.com

Sherzod P. Abdullaev*, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education;
e-mail: sherzodx5@gmail.com

Мирзаев Карин Бадавиевич, к.м.н., ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России;
e-mail: karin05doc@yandex.ru

Karin B. Mirzayev, Cand. Sci. (Med.), Russian Medical Academy of Continuous Professional Education;
e-mail: karin05doc@yandex.ru

Рыжикова Кристина Анатольевна, ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России;
e-mail: kriistinkaa@mail.ru

Kristina A. Ryzhikova, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education;
e-mail: kriistinkaa@mail.ru

Шуев Григорий Николаевич, ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России;
e-mail: shuevgrigorii@gmail.com

Grigoriy N. Shuyev, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education;
e-mail: shuevgrigorii@gmail.com

Гришина Елена Анатольевна, к.б.н., ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России;
e-mail: gelana2010@yandex.ru

Elena A. Grishina, Cand. Sci. (Biology), Russian Medical Academy of Continuous Professional Education;
e-mail: gelana2010@yandex.ru

Созаева Жаннет Алимовна, ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России;
e-mail: zhannet.sozaeva@yandex.ru

Zhannet A. Sozaeva, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education;
e-mail: zhannet.sozaeva@yandex.ru

Маммаев Сулейман Нурагитинович, д.м.н., проф., ФГБОУ ВО «Дагестанский государственный медицинский университет» Минздрава России;
e-mail: hepar-sul-dag@mail.ru

Suleyman N. Mammaev, Dr. Sci. (Med.), Professor, Dagestan State Medical University;
e-mail: hepar-sul-dag@mail.ru

Гафуров Даниял Мусаевич, ГБУ РД «Лакская центральная районная больница»;
e-mail: daniyalgafurov@mail.ru

Daniyal M. Gafurov, Lak Central Regional Hospital;
e-mail: daniyalgafurov@mail.ru

Китаева Елена Юрьевна, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека»;

e-mail: kitaevaey@mail.ru

Шпрах Владимир Викторович, д.м.н., проф., Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования — филиал ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России;

e-mail: irkmapo@irk.ru

Сулейманов Салават Шейхович, д.м.н., проф., Российско-японский медицинский центр «Саико»;

e-mail: info@saiko.ru

Болиева Лаура Зелимхановна, д.м.н., проф., ФГБОУ ВО «Северо-Осетинская государственная медицинская академия» Минздрава России;

e-mail: bolievalz@mail.ru

Созаева Мариям Султан-Хамитовна, ГБУЗ «Республиканская клиническая больница» Минздрава Кабардино-Балкарской Республики;

e-mail: msozaeva@yandex.ru

Жучкова Светлана Михайловна, к.м.н., АУ «Республиканский клинический онкологический диспансер» Минздрава Чувашии;

e-mail: crista007@mail.ru

Гималдинова Наталья Евгеньевна, к.м.н., ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова»;

e-mail: rufer06@rambler.ru

Сидукова Елена Эдуардовна, ГБУ Республики Марий Эл «Козьмодемьянская межрайонная больница»;

e-mail: kozmcrb@minzdrav12.ru

Elena Yu. Kitaeva, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems;

e-mail: kitaevaey@mail.ru

Vladimir V. Shprakh, Dr. Sci. (Med.), Professor, Irkutsk State Medical Academy of Postgraduate Education — branch of the Russian Medical Academy of Continuous Professional Education;

e-mail: irkmapo@irk.ru

Salavat Sh. Suleymanov, Dr. Sci. (Med.), Professor, SAIKO Russian-Japanese Medical Center;

e-mail: info@saiko.ru

Laura Z. Bolieva, Dr. Sci. (Med.), Professor, North Ossetian State Medical Academy;

e-mail: bolievalz@mail.ru

Mariyam S.-Kh. Sozaeva, Clinical Hospital of the Republic of Kabardino-Balkaria;

e-mail: msozaeva@yandex.ru

Svetlana M. Zhuchkova, Cand. Sci. (Med.), Clinical Oncologic Dispensary of the Republic of Chuvashia;

e-mail: crista007@mail.ru

Natalya E. Gimaldinova, Cand. Sci. (Med.), Chuvash State University n.a. I.N. Ulyanov;

e-mail: rufer06@rambler.ru

Elena E. Sidukova, Kozmodemyansk Interdistrict Hospital;

e-mail: kozmcrb@minzdrav12.ru

Асоскова Анастасия Валерьевна, ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России;

e-mail: stasya.asoskova@mail.ru

Anastasiya V. Asoskova, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education;

e-mail: stasya.asoskova@mail.ru

Мумладзе Роберт Борисович, д.м.н, проф., ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России;

e-mail: surgery-rmapo@rambler.ru

Robert B. Mumladze, Dr. Sci. (Med.), Professor, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education;

e-mail: surgery-rmapo@rambler.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

БИОЭЛЕКТРИЧЕСКИЙ ИМПЕДАНС ТЕЛА КРЫС ПРИ МОНОКРОТАЛИНОВОЙ МОДЕЛИ ЛЕГОЧНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ

Н.Л. Коломеец^{1,*}, О.В. Суслонова¹, С.Л. Смирнова¹, И.М. Рощевская²

¹ ФГБУН ФИЦ «Коми научный центр Уральского отделения Российской академии наук»
167982, Российская Федерация, Сыктывкар, ул. Коммунистическая, д. 24

² ФГБОУ ВО «Сыктывкарский государственный университет им. Питирима Сорокина»
167001, Российская Федерация, Сыктывкар, Октябрьский пр., д. 55

Показатели биоэлектрического импеданса тела и легких изучены у крыс популяции линий Wistar с экспериментально вызванной легочной гипертензией. Выявлено значимо меньшее абсолютное значение реактивного сопротивления ($32,9 \pm 4,9$ Ом в сравнении с $39,3 \pm 5,3$ Ом в контрольной группе, $p=0,023$), фазового угла ($7,1 \pm 0,6^\circ$ в сравнении с $8,2 \pm 0,6^\circ$ в контрольной группе, $p=0,002$) при низкой частоте переменного тока и тенденция к снижению активного сопротивления биоэлектрического импеданса тела у крыс после введения монокроталина, что свидетельствует о накоплении внеклеточной жидкости в организме при развитии легочной гипертензии. Электрическое сопротивление легких у крыс с экспериментальной моделью легочной гипертензии снижается (значимо при 150 кГц: $R_{\text{опыт}} = 398,9 \pm 240,2$ Ом, $R_{\text{контр}} = 647,2 \pm 270,5$ Ом, $p=0,043$), что может быть связано со структурными изменениями в легких.

Ключевые слова: биоэлектрический импеданс тела, монокроталиновая модель легочной гипертензии

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: Работа выполнена при финансовой поддержке комплексной программы развития УрО РАН «Электрическая активность сердца крыс при хронической сердечной недостаточности» № 18-7-8-11.

Для цитирования: Коломеец Н.Л., Суслонова О.В., Смирнова С.Л., Рощевская И.М. Биоэлектрический импеданс тела крыс при монокроталиновой модели легочной гипертензии. *Биомедицина*. 2019;15(1):95–101. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-1-95-101>

Поступила 25.07.2018

Принята после доработки 07.12.2018

Опубликована 10.03.2019

BIOELECTRICAL IMPEDANCE OF THE BODY IN RATS WITH MONOCROTALINE-INDUCED PULMONARY HYPERTENSION

Nataliia L. Kolomeyets^{1,*}, Olga V. Suslonova¹, Svetlana L. Smirnova¹,
Irina M. Roshchevskaya²

¹ Komi Scientific Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences
167982, Russian Federation, Syktyvkar, Kommunisticheskaya str., 24

² Pitirim Sorokin Syktyvkar State University
167001, Russian Federation, Syktyvkar, Octjabrskii prospect, 55

Wistar rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension were investigated using bioelectrical impedance analysis. Monocrotaline-treated rats compared to sham-treated rats demonstrated significantly lower absolute values of such components of bioelectrical impedance as the reactive resistance (32.9 ± 4.9 Ohm vs. 39.3 ± 5.3 Ohm in the sham control, $p=0.023$) and the phase angle ($7.1 \pm 0.6^\circ$ vs. $8.2 \pm 0.6^\circ$ in the

sham control, $p=0.002$). The active resistance of the bioelectrical impedance of the lung showed a downward trend in rats having undergone monocrotaline treatment (with a significantly lower value at 150 kHz: 398.9 ± 240.2 Ohm vs. 647.2 ± 270.5 Ohm in the sham control, $p=0.043$). A decrease in the whole-body and pulmonary bioimpedance values under our experimental conditions is shown to result from accumulation of the whole-body or intrathoracic fluid and physiological changes in the tissues during the development of pulmonary arterial hypertension.

Keywords: bioelectrical impedance of the body, monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension

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

Funding: The research was supported with the integrated development program of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences “Electrical activity of the heart of rats with congestive heart failure” No. 18-7-8-11.

For citation: Kolomeyets N.L., Suslova O.V., Smirnova S.L., Roshchevskaya I.M. Bioelectrical Impedance of the Body in Rats with Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension. *Biomedicine*. 2019;15(1):2019;15(1):95–101. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-1-95-101>

Submitted 25.07.2018

Revised 07.12.2018

Published 10.03.2019

Введение

Легочная гипертензия — патофизиологическое состояние, сопровождающееся прогрессирующим увеличением легочного сосудистого сопротивления, гипертрофией правого желудочка и правожелудочковой недостаточностью [12]. Изучение механизмов развития легочной гипертензии осуществляется на модельных животных, одной из которых является введение монокроталина для развития структурных изменений легочных артерий [13]. В зависимости от введенной дозы препарата развивается гипертрофия правого желудочка [7], правожелудочковая недостаточность с ее признаками: плевральным выпотом, асцитом [11].

Биоимпедансный анализ позволяет контролировать динамику изменений водного баланса у больных сердечно-сосудистыми заболеваниями [4]; в т. ч. увеличение общей жидкости организма при правожелудочковой сердечной недостаточности [14]. Разработана процедура биоимпедансного анализа у животных для оценки содержания воды и состава тела [8].

Цель работы — оценка параметров биоэлектрического импеданса тела крыс с индуцированной монокроталином легочной гипертензией.

Материалы и методы

Исследования проведены на самцах крыс популяции линий Wistar (20 особей) массой тела $308,1 \pm 34,5$ г, возрастом 3–4 мес., полученных из питомника ФГУП ПЛЖ «Рапполово» (Санкт-Петербург). Животных содержали в условиях свободного доступа к водопроводной питьевой воде и корму в помещении с естественно-искусственным освещением. Крысы находились в вентилируемых клетках группами по 2–3 особи при температуре $20\text{--}22^\circ\text{C}$ на подстилке из древесных стружек.

Эксперименты проведены на крысах под зоветиловым наркозом ($2,5$ мг/100 г массы тела внутримышечно). Первую группу (опытную) составили 15 животных, которым моделировали легочную гипертензию путем подкожного введения однократной дозы монокроталина (80 мг/кг; Sigma-Aldrich, Germany). Крысам в группе контроля ($n=5$) вводили сопоставимую дозу физ. р-ра ($0,9\%$ NaCl).

Биоимпедансные исследования у крыс были проведены спустя 1 мес. после введения препарата или физ. р-ра. Биоэлектрический импеданс регистрировали при помощи анализатора физических свойств материалов и веществ 126094W (Solartron

Analytical, Великобритания). Полученные измерения отражали усредненную во времени характеристику электрического сопротивления.

Измерения биоэлектрического импеданса тела выполняли тетраполярным методом. Игольчатые электроды из нержавеющей стали размещали согласно рекомендациям [8], предложенным для оценки состава тела у крысы.

Наркотизированным животным перед вскрытием грудной клетки проводили трахеотомию и переводили их на искусственное дыхание. Частоту и глубину дыхания подбирали индивидуально для каждого животного, поддерживали постоянную температуру тела (37°C). Измерение электрического импеданса проводили на поверхности легких с использованием датчика с медными электродами [3].

Массу тела (г) крыс определяли с помощью лабораторных электронных весов Асом JW-1 (Корея), измеряли длину тела без хвоста (см), вычисляли индекс массы тела.

По окончании эксперимента сердца вырезали, изготавливали поперечные гистологические срезы толщиной 7 мкм на микротоме-криостате (Leica CM 1510S, Германия), окрашивали гематоксилином и эозином по стандартной методике. Гистологические срезы фотографировали камерой-окулярном DCM 500 (Бельгия) и анализировали с помощью программы для визуализации и математического измерения Scope Photo. Оценивали толщину правого, левого желудочков и межжелудочковой перегородки на уровне папиллярных мышц левого желудочка.

Сравнивали значения компонентов биоэлектрического импеданса тела крыс: активное сопротивление (R) биоэлектрического импеданса при 10–200 кГц синусоидального тока, реактивное сопротивление (Im), фазовый угол (ϕ) биоэлектрического импеданса при 10–100 кГц; электрическое сопротивление (R) легких крыс при 30–200 кГц.

Для проверки нормальности распределения количественных признаков использовали критерий Шапиро — Уилка. Равенство дисперсий распределений признаков в группах проверяли по критерию Левена. Количественные признаки представлены как среднее арифметическое $\pm$ стандартное отклонение. Сравнения двух групп из совокупностей с нормальным распределением проводили с помощью t -критерия Стьюдента, отличающихся от нормального распределения — по критерию Манна — Уитни. Для множественных сравнений (при разных частотах тока) использовали однофакторный дисперсионный анализ с последующим тестом Бонферрони. Уровень значимости различий принимали равным 0,05. В качестве меры тенденции использовали выборочное среднее.

Результаты и их обсуждение

Монокроталиновая модель легочной гипертензии характеризуется общим воспалением, токсическим повреждением периферических сосудов легких, сердца и др. органов [13]. При однократном введении монокроталина у животных наблюдали оккелосудистый отек, значимое утолщение альвеолярной стенки, аномальную эпителиальную гиперплазию легких, интерстициальную пневмонию, миокардит [6, 10].

Нами были отмечены значимо большие значения относительной массы сердца ($3,7 \pm 0,4$ г/кг) у крыс с экспериментальной легочной гипертензией, чем у крыс контрольной группы ($3,2 \pm 0,2$ г/кг, $p=0,021$), связанные с развитием гипертрофии миокарда. У 87% крыс опытной группы гистологически выявили гипертрофию правого желудочка, существенное увеличение толщины правого желудочка от $0,98 \pm 0,11$ до $1,86 \pm 0,21$ мм по сравнению с крысами контрольной группы. У 13% крыс опытной группы показана дилатация правого желудочка. Толщины левого желудочка и межжелудочковой перегородки у живот-

ных опытной и контрольной групп достоверно не отличались.

Электрическое сопротивление легочной ткани у крыс с монокроталиновой моделью гипертензии было значимо меньше по сравнению с контрольными при 150 кГц ($R_{150, \text{опыт}} = 398,9 \pm 240,2$ Ом, $R_{150, \text{контр}} = 647,2 \pm 270,5$ Ом, $p = 0,043$), при остальных частотах имело тенденцию к снижению в сравнении с контролем (рис. 1).

Достоверное снижение электрического сопротивления мягких тканей было показано в стадии инфильтрации [5]. При интерстициальной пневмонии, характеризующейся утолщением альвеолярной стенки и уменьшением содержания воздуха в легочной ткани, и при отеке растет электрическая проводимость легочной ткани [9]. Нами показано уменьшение сопротивления легочной ткани у крыс при иных формах артериальной гипертензии: у животных со спонтанной гипертензией линии SHR [2] и стрессиндуцированной артериальной гипертензией линии НИСАГ [3], свиде-

тельствующее об увеличении объема крови и интерстициальной жидкости.

Снижение активного сопротивления легочной ткани у крыс спустя 1 мес. после введения монокроталина может указывать на увеличение объема внеклеточной жидкости при пролиферативных изменениях, воспалительном процессе в легких, развитии правожелудочковой гипертрофии и легочной артериальной гипертензии.

У крыс опытной группы не обнаружено значимых различий в массе, длине тела и индексе массы тела по сравнению с контрольными.

У крыс с монокроталиновой моделью легочной гипертензии в сравнении с крысами контрольной группы значимо изменились реактивное электрическое сопротивление ($Im_{\text{опыт}} = -32,9 \pm 4,9$ Ом и $Im_{\text{контр}} = -39,3 \pm 5,3$ Ом; $p = 0,023$) и фазовый угол ($\phi_{\text{опыт}} = -7,1 \pm 0,6^\circ$ и $\phi_{\text{контр}} = -8,2 \pm 0,6^\circ$; $p = 0,002$) биоэлектрического импеданса тела при частоте синусоидального тока 30 кГц. При большинстве частот наблюдалась тенденция снижения абсолютного значения реактивного сопротивления и фазового угла биоэлектрического импеданса тела у крыс в опытной группе в сравнении с контролем (рис. 2, 3). Выявлена тенденция снижения активного сопротивления биоэлектрического импеданса тела у крыс опытной группы в сравнении с контролем.

Увеличение биоэлектрического импеданса тела отмечено у пациентов с плевральным выпотом при низких частотах при удалении жидкости при плевральной пункции [15]. Сниженные (абсолютные) значения реактивного сопротивления и фазового угла электрического импеданса тканей, сегментов тела у пациентов с тяжелыми хроническими заболеваниями указывают на множественные нарушения состояния клеточных мембран [4]. Ранее нами были показаны значительное увеличение абсолютного значения реактивного сопротивления, тенденция к увеличению амплитуды биоэлектрического импеданса тела у ста-

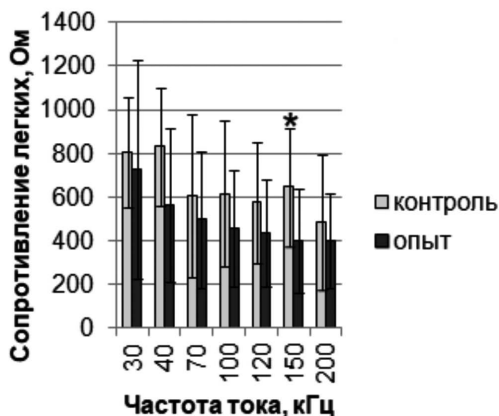


Рис. 1. Активное сопротивление биоэлектрического импеданса легких у крыс в контрольной (контроль) и опытной (опыт) группах. * — значимое различие у крыс с экспериментальной легочной гипертензией в сравнении с контрольной группой ($F_{1,18} = 4,72$, $p = 0,043$).

Fig. 1. Active resistance of the bioelectrical impedance of the lungs in rats in the control (control) and experimental (experiment) groups. * — a significant difference in rats with experimental pulmonary hypertension compared with the control group ($F_{1,18} = 4.72$, $p = 0.043$).

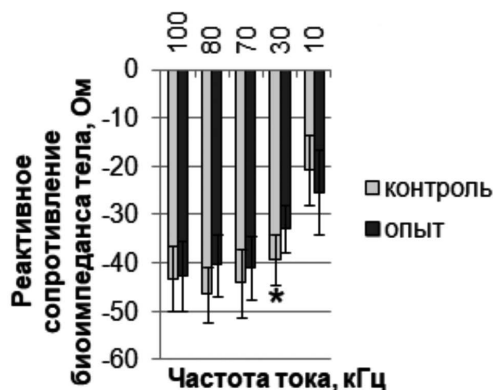


Рис. 2. Реактивное сопротивление биоэлектрического импеданса тела у крыс в контрольной (контроль) и опытной (опыт) группах. * — значимое различие у крыс с экспериментальной легочной гипертензией в сравнении с контрольной группой ($F_{1,18}=6,18$, $p=0,023$).

Fig. 2. Reactive resistance of the bioelectrical impedance in rats in the control (control) and experimental (experiment) groups. * — a significant difference in rats with experimental pulmonary hypertension compared with the control group ($F_{1,18}=6.18$, $p=0.023$).

реющих крыс популяции линий Wistar по сравнению с молодыми, связанные с изменениями физиологического состояния организма при старении, уменьшением содержания воды в тканях [1].

Выводы

Показаны значимое снижение абсолютных значений реактивного сопротив-

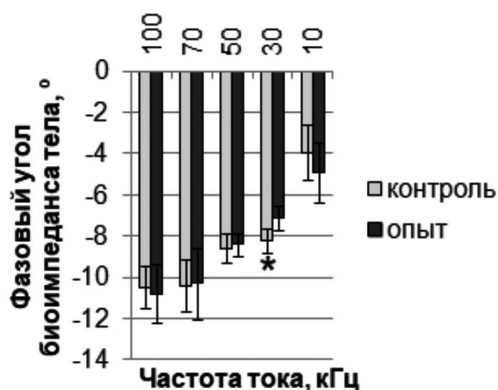


Рис. 3. Фазовый угол биоэлектрического импеданса тела у крыс в контрольной (контроль) и опытной (опыт) группах. * — значимое различие у крыс с экспериментальной легочной гипертензией в сравнении с контрольной группой ($F_{1,18}=13,62$, $p=0,002$).

Fig. 3. Phase angle of the bioelectrical impedance in rats in the control (control) and experimental (experiment) groups. * — a significant difference in rats with experimental pulmonary hypertension compared with the control group ($F_{1,18}=13.62$, $p=0.002$).

ления и фазового угла биоэлектрического импеданса тела при низкой частоте тока и тенденция к снижению активного сопротивления биоимпеданса легочной ткани и тела крыс, свидетельствующие о накоплении внеклеточной жидкости в организме крыс, вызванном развитием индуцированной монокроталином легочной гипертензии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Коломеец Н.Л., Рощевская И.М. Биоэлектрический импеданс тела нормотензивных и гипертензивных стареющих крыс // Современные проблемы науки и образования. — 2017. — № 6.
2. Коломеец Н.Л., Рощевская И.М. Электрическое сопротивление легких и межреберных мышц у крыс с артериальной гипертензией // Практическая Медицина. — 2017. — № 2. — С. 50–55.
3. Коломеец Н.Л., Смирнова С.Л., Рощевская И.М. Электрическое сопротивление легких, межреберных мышц и почки гипертензивных крыс линии НИСАГ // Биофизика. — 2016. — Т. 61. Вып. 3. — С. 590–597.
4. Николаев Д.В., Смирнов А.В., Бобринская И.Г., Руднев С.Г. Биоимпедансный анализ состава тела человека. — М.: Наука, 2009. — 392 с.
5. Торнуев Ю.В., Хачатрян Р.Г., Хачатрян А.П., Махнев В.П., Осенний А.С. Электрический импеданс биологических тканей. — М.: Изд-во ВЗПИ, 1990. — 155 с.
6. Gomez-Arroyo J.G., Farkas L., Alhussaini A.A., Farkas D., Kraskauskas D., Voelkel N.F., Bogaard H.J. The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective // Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. — 2012. — Vol. 302, No. 4. — Pp. L363–369.
7. Hessel M.H., Steendijk P., den Adel B., Schutte C.I., van der Laarse A. Characterization of right ventricular function after monocrotaline-induced pulmonary hypertension in the intact rat // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. — 2006. — Vol. 291, No. 5. — Pp. H2424–2430.

8. Hu L., Maslanik T., Zerebeckyj M., Plato C.F. Evaluation of bioimpedance spectroscopy for the measurement of body fluid compartment volumes in rats // *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. — 2012. — Vol. 65. — Pp. 75–82.
9. Nopp P., Rapp E., Pfutzner H., Nakesch H., Ruhsam C. Dielectric properties of lung tissue as a function of air content // *Phys. Med. Biol.* — 1993. — Vol. 38. — Pp. 699–716.
10. Ogata T., Shibagaki T., Kamma H., Yokose T., Iizima T. Alveolar damage: epithelial damage and endothelial damage // *Journal of Toxicologic Pathology*. — 1989. — Vol. 2, No. 2. — Pp. 223–240.
11. Sanyal S.N., Ono K. Derangement of autonomic nerve control in rat with right ventricular failure // *Pathophysiology*. — 2002. — Vol. 8, No. 3. — Pp. 197–203.
12. Simonneau G., Galie N., Rubin L.J., Langleben D., Seeger W., Domenighetti G., Gibbs S., Lebrec D., Speich R., Beghetti M., Rich S., Fishman A. Clinical classification of pulmonary hypertension // *J. Am. Coll. Cardiol.* — 2004. — Vol. 43, No. 12. — Pp. 5S–12S.
13. Stenmark K.R., Meyrick B., Galie N., Mooi W.J., McMurtry I.F. Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* — 2009. — Vol. 297, No. 6. — Pp. L1013–1032.
14. Walter-Kroker A., Kroker A., Mattiucci-Guehlke M., Glaab T. A practical guide to bioelectrical impedance analysis using the example of chronic obstructive pulmonary disease // *Nutr. J.* — 2011. — Vol. 10, No. 35. — Pp. 1–8.
15. Zink M.D., Weyer S., Pauly K., Napp A., Dreher M., Leonhardt S., Marx N., Schauerte P., Mischke K. Feasibility of Bioelectrical Impedance Spectroscopy Measurement before and after Thoracentesis // *Biomed. Res. Int.* — 2015. — Vol. 2015. Article ID 810797. — Pp. 1–9.

REFERENCES

1. Kolomeyets N.L., Roshchevskaya I.M. Bioelektricheskiy impedans tela normotenzivnyh i gipertenzivnyh stareyushchih kryss [Whole body bioelectrical impedance in normotensive and hypertensive senescent rats]. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya* [Modern problems of science and education]. 2017. No. 6. (In Russian).
2. Kolomeyets N.L., Roshchevskaya I.M. Elektricheskoe soprotivleniye legkih i mezhrubernykh myshc u kryss s arterial'noj gipertenziey [The electrical resistance of the lungs and intercostal muscles in rats with arterial hypertension]. *Prakticheskaya Meditsina* [Practical medicine]. 2017. No. 2. Pp. 50–55. (In Russian).
3. Kolomeyets N.L., Smirnova S.L., Roshchevskaya I.M. The electrical resistance of the lungs, intercostal muscles, and kidneys in hypertensive ISIAH rats. *Biophysics*. 2016. Vol. 61, Issue 3. Pp. 498–504. (In Russian).
4. Nikolaev D.V., Smirnov A.V., Bobrinskaya I.G., Rudnev S.G. Bioimpedansnyy analiz sostava tela cheloveka [Bioelectric impedance analysis of human body composition]. Moscow: Nauka, 2009. 392 p. (In Russian).
5. Tornuev Yu.V., Hachatrian R.G., Hachatrian A.P., Mahnev V.P., Osenniy A.S. Elektricheskiiy impedans biologicheskikh tkaney [Electrical impedance of biological tissues]. Moscow: Izd-vo VZPI. 1990. 155 p. (In Russian).
6. Gomez-Arroyo J.G., Farkas L., Alhussaini A.A., Farkas D., Kraskauskas D., Voelkel N.F., Bogaard H.J. The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2012. Vol. 302. No. 4. Pp. L363–369.
7. Hessel M.H., Steendijk P., den Adel B., Schutte C.I., van der Laarse A. Characterization of right ventricular function after monocrotaline-induced pulmonary hypertension in the intact rat. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2006. Vol. 291. No. 5. Pp. H2424–2430.
8. Hu L., Maslanik T., Zerebeckyj M., Plato C.F. Evaluation of bioimpedance spectroscopy for the measurement of body fluid compartment volumes in rats. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 2012. Vol. 65. Pp. 75–82.
9. Nopp P., Rapp E., Pfutzner H., Nakesch H., Ruhsam C. Dielectric properties of lung tissue as a function of air content. *Phys. Med. Biol.* 1993. Vol. 38. Pp. 699–716.
10. Ogata T., Shibagaki T., Kamma H., Yokose T., Iizima T. Alveolar damage: epithelial damage and endothelial damage. *Journal of Toxicologic Pathology*. 1989. Vol. 2, No. 2. Pp. 223–240.
11. Sanyal S.N., Ono K. Derangement of autonomic nerve control in rat with right ventricular failure. *Pathophysiology*. 2002. Vol. 8, No. 3. Pp. 197–203.
12. Simonneau G., Galie N., Rubin L.J., Langleben D., Seeger W., Domenighetti G., Gibbs S., Lebrec D., Speich R., Beghetti M., Rich S., Fishman A. Clinical classification of pulmonary hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2004. Vol. 43, No. 12. Pp. 5S–12S.
13. Stenmark K.R., Meyrick B., Galie N., Mooi W.J., McMurtry I.F. Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2009. Vol. 297, No. 6. Pp. L1013–1032.
14. Walter-Kroker A., Kroker A., Mattiucci-Guehlke M., Glaab T. A practical guide to bioelectrical impedance analysis using the example of chronic obstructive pulmonary disease. *Nutr. J.* 2011. Vol. 10, No. 35. Pp. 1–8.
15. Zink M.D., Weyer S., Pauly K., Napp A., Dreher M., Leonhardt S., Marx N., Schauerte P., Mischke K. Feasibility of Bioelectrical Impedance Spectroscopy Measurement before and after Thoracentesis. *Biomed. Res. Int.* 2015. Vol. 2015. Article ID 810797. Pp. 1–9.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Коломеец Наталия Леонидовна*, к.ф.-м.н., Вьльгортская научно-экспериментальная биологическая станция — филиал ФГБУН ФИЦ «Коми научный центр Уральского отделения Российской академии наук»;

e-mail: nat.kolomeyets@gmail.com

Суслонова Ольга Владимировна, Вьльгортская научно-экспериментальная биологическая станция — филиал ФГБУН ФИЦ «Коми научный центр Уральского отделения Российской академии наук»

Смирнова Светлана Леонидовна, к.б.н., Вьльгортская научно-экспериментальная биологическая станция — филиал ФГБУН ФИЦ «Коми научный центр Уральского отделения Российской академии наук»

Рощевская Ирина Михайловна, д.б.н., член-корр. РАН, ФГБОУ ВО «Сыктывкарский государственный университет им. Питирима Сорокина»;

e-mail: compcard@mail.ru

Nataliia L. Kolomeyets*, Cand. Sci. (Phys.-Math.), Vylgort Science Experimental Biologic Station — branch of the Komi Scientific Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences;

e-mail: nat.kolomeyets@gmail.com

Olga V. Suslonova, Vylgort Science Experimental Biologic Station — branch of the Komi Scientific Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences

Svetlana L. Smirnova, Cand. Sci. (Biology), Vylgort Science Experimental Biologic Station — branch of the Komi Scientific Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences

Irina M. Roshchevskaya, Dr. Sci. (Med.), Corresponding Member of the RAS, Pitirim Sorokin Syktvykar State University;

e-mail: compcard@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ДЕЙСТВИИ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА И ОКСИДА АЗОТА

А.К. Мартусевич^{1,3,4,*}, А.А. Мартусевич^{2,4}, А.В. Дерюгина², С.П. Перетягин⁴

¹ Университетская клиника ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России

603155, Российская Федерация, Нижний Новгород, Верхне-Волжская наб., д. 18/1

² ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»

603022, Российская Федерация, Нижний Новгород, просп. Гагарина, д. 23

³ ФГБОУ ВО «Кировский государственный медицинский университет» Минздрава России

610027, Российская Федерация, Киров, ул. Карла Маркса, д. 112

⁴ Ассоциация российских озонотерапевтов

603089, Российская Федерация, Нижний Новгород, ул. Бориса Панина, д. 9

Целью работы служило изучение электрофоретической подвижности эритроцитов при действии экзогенных активных форм кислорода и оксида азота на образцы крови и организм здоровых крыс. Первый этап эксперимента (*in vitro*) выполнен на образцах крови 15 здоровых доноров. Каждый образец был разделен на 5 равных порций по 5 мл, первая из которых являлась контрольной (в ней не проводили никаких манипуляций), остальные барботировали различными газовыми смесями (озоно-кислородной смесью с концентрацией озона 60 мг/л; синглетно-кислородной воздушной смеси; NO-содержащей газовой смесью с концентрацией оксида азота 20 и 100 ppm). Второй этап эксперимента (*in vivo*) выполнен на 40 половозрелых крысах-самцах популяции линий Wistar, разделенных на 7 групп. Первая группа животных (n=10) являлась контрольной. Животные второй группы (n=5) на протяжении 10 дней получали ежедневные ингаляции озоно-кислородной смеси. Крысам третьей и четвертой групп (n=5 в каждой) в течение 10 дней осуществляли ежедневные ингаляции синглетно-кислородной газовой смеси (50 и 100% мощности генератора), а пятой-седьмой групп (n=5 в каждой) — NO (концентрация соединения — 20, 50 и 100 ppm соответственно). На основании проведенных исследований обнаружен единый характер реагирования биосистем на непосредственное (при обработке крови) и опосредованное (в форме ингаляций) воздействие данных соединений в изучаемых условиях. Так, озоно-кислородная смесь и высокие концентрации оксида азота (100 ppm) обеспечивают снижение электрофоретической подвижности эритроцитов. Напротив, более низкие дозы NO (20 ppm) и синглетный кислород оказывают стабилизирующее влияние на состояние мембран красных клеток крови, повышая антиоксидантный потенциал биосреды. Подобный эффект указанных факторов способствует стимуляции электрокинетических свойств эритроцитов в эксперименте *in vivo* (при курсовых ингаляциях).

Ключевые слова: эритроциты, электрофоретическая подвижность, озон, синглетный кислород, оксид азота

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Мартусевич А.К., Мартусевич А.А., Дерюгина А.В., Перетягин С.П. Электрофоретическая оценка состояния мембран эритроцитов при действии активных форм кислорода и оксида азота. *Биомедицина*. 2019;15(1):102–112. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-1-102-112>

Поступила 19.11.2018

Принята после доработки 15.01.2019

Опубликована 10.03.2019

ELECTROPHORETIC STUDY OF ERYTHROCYTE MEMBRANES UNDER THE ACTION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES AND NITRIC OXIDE

Andrey K. Martusevich^{1,3,4,*}, Anastasiia A. Martusevich^{2,4}, Anna V. Deriugina²,
Sergey P. Peretyagin⁴

¹ University Clinic of the Privolzhsky Research Medical University
603155, Russian Federation, Nizhny Novgorod, Verhne-Volzhskaya embankment, 18/1

² Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod
60360023, Russian Federation, Nizhny Novgorod, Gagarina avenue, 23

³ Kirov State Medical University
610027, Russian Federation, Kirov, Karla Marksa str., 112

⁴ Russian Association of Ozone Therapy
603089, Russian Federation, Nizhny Novgorod, Borisa Panina str., 9

This study was aimed at estimating the erythrocyte electrophoretic mobility by investigating the effect of exogenous reactive oxygen species and nitric oxide on the blood specimens and organism of healthy rats. In the first (*in vitro*) experimental stage, blood specimens taken from 15 healthy people were analyzed. Each specimen was divided into 5 portions (5 ml.). One portion was used as a control (without any manipulations), with the rest being treated with different gas mixtures, including an ozone-oxygen mixture with the ozone dose of 60 mg/l; singlet oxygen and an NO-containing gas mixture with 20 and 100 ppm of NO. The second (*in vivo*) experimental stage was performed on 40 male Wistar rats divided into 7 groups. The first group (n=10) was considered to be a control group. Animals in the second group (n=5) were given daily inhalations with the ozone-oxygen mixture. Rats in the third and fourth groups (n=5 in each) received inhalations with singlet oxygen (under the power of the generator of 50 and 100%, respectively). Animals in the fifth, sixth and seventh groups (n=5 in each) were given daily inhalations with nitric oxide (under the NO concentration of 20, 50 and 100 ppm, respectively). Our study has demonstrated the biosystems under study to exhibit identical response patterns both to direct (blood treatment) and indirect (inhalations) action of the investigated substances. Thus, the ozone-oxygen mixture and high doses of nitric oxide (100 ppm) are shown to result in a decrease in the electrophoretic mobility of erythrocytes. Alternatively, both low NO doses (20 ppm) and singlet oxygen stabilize erythrocyte membranes by elevating the antioxidant potential of the biofluid. These effects contribute to the activation of erythrocyte electrokinetic properties *in vivo* experiments (after a course of inhalations).

Keywords: erythrocyte, electrophoretic motility, ozone, singlet oxygen, nitric oxide

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

For citation: Martusevich A.K., Martusevich A.A., Deriugina A.V., Peretyagin S.P. Electrophoretic Study of Erythrocyte Membranes under the Action of Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide. *Biomedicine*. 2019;15(1):102–112. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-1-102-112>

Submitted 19.11.2018

Revised 15.01.2019

Published 10.03.2019

Введение

Биорадикалы, преимущественно представленные в живых системах активными формами кислорода (АФК) и оксидом азота [3, 8, 13], в настоящее время рассматриваются в качестве универсальных низкомолекулярных биорегуляторов, оказывающих влияние на широкий спектр физиологических и патологических процессов [4, 8, 24]. Их регуляторное значение прослеживается в отношении большинства метаболических путей, реализующихся на клеточно-тканевом уровне [1, 3, 8, 13, 15]. Учитывая нелинейность биологического ответа живых систем на действие экзогенных и эндогенных биорадикалов, доза последних может рассматриваться в качестве фактора, лимитирующего их эффект [10, 17, 23].

С другой стороны, исследования в области свободнорадикальной медицины преимущественно ориентированы на изучение особенностей модулирующего действия эндогенных биорадикалов на различные параметры биосистем [4, 8], тогда как характер влияния экзогенных соединений с радикальными свойствами до сих пор не раскрыт достаточно полноценно [12, 24]. В частности, на фоне наличия данных об особенностях протекания окислительных процессов в мембранах эритроцитов под влиянием АФК и монооксида азота не уточнен характер воздействия биорадикалов на электрокинетические свойства эритроцитов, зависящие от состояния мембран последних [17, 23]. Ранее публикациями нашего коллектива и работами др. авторов было показано, что электрофоретическая подвижность эритроцитов (ЭФПЭ), являющаяся их количественным критерием, может рассматриваться как неспецифический индикатор состояния эритрона и его реакции на изменения гомеостаза и внешние воздействия на организм [5, 20]. В то же время подобные сведения имеются лишь в отношении озона, причем они приводятся только в единичных источниках [17]. На основании этого **целью работы** служило

изучение электрофоретической подвижности эритроцитов при действии экзогенных активных форм кислорода и оксида азота на образцы крови и организм здоровых крыс.

Материалы и методы

Проведенное исследование имело двухэтапный дизайн, причем на первом этапе изучали непосредственное влияние активных форм кислорода и оксида азота на кровь, а на втором — характер опосредованного эффекта указанных факторов на организм животного при ингаляционном применении.

Первый этап эксперимента (*in vitro*) выполнен на образцах крови 15 здоровых доноров. Каждый образец был разделен на 5 равных порций по 5 мл, первая из которых являлась контрольной (в ней не проводили никаких манипуляций), остальные барботировали различными газовыми смесями (единые параметры обработки для всех воздействий: объем газовой смеси — 100 мл, продолжительность барботирования — 3 мин [13]). Вторую порцию крови обрабатывали озono-кислородной смесью (концентрация озона — 60 мг/л), третью — синглетно-кислородной воздушной смесью (примененная мощность генератора — 100%), а четвертую и пятую — NO-содержащей газовой смесью (концентрация оксида азота — 20 и 100 ppm соответственно). Барботаж производили путем медленного пропускания указанных газов через весь объем биологической жидкости, находящейся в стандартной стеклянной пробирке (выходное отверстие — выпускник газа — находилось на дне пробирки). Продолжительность экспозиции после обработки — 5 мин.

Второй этап эксперимента (*in vivo*) выполнен на 40 половозрелых крысах-самцах популяции линий Wistar, разделенных на 7 групп. Первая группа животных (n=10) являлась контрольной, с ними не проводили никаких манипуляций, кроме однократного получения крови. Животные второй группы

($n=5$) на протяжении 10 дней получали ежедневные ингаляции озоно-кислородной смеси. Крысам третьей и четвертой групп ($n=5$ в каждой) в течение 10 дней осуществляли ежедневные ингаляции синглетно-кислородной газовой смеси (50 и 100% мощности генератора), а пятой–седьмой групп ($n=5$ в каждой) — оксида азота (концентрация соединения в газовом потоке — 20, 50 и 100 ppm для указанных групп соответственно). Продолжительность воздействия составляла 10 мин, скорость потока газовой смеси — 2 л/мин. Синтез NO-содержащей воздушной смеси осуществляли с помощью экспериментального генератора, разработанного в РФЯЦ-ВНИИЭФ (г. Саров, Россия) [7]. Воздушный поток, содержащий синглетный кислород, получали с применением аппарата Airnergy (Германия). Для проведения ингаляций крыс (по одной) помещали в эксикатор, через который осуществляли продувание газового потока.

По завершении полного курса воздействий у животных всех основных групп получали образцы крови. Из них выделяли эритроциты трехкратным отмыванием 0,85% р-ром хлористого натрия с последующим центрифугированием в течение 10 мин при 1500 об./мин. Измерение ЭФПЭ проводили методом микроэлектрофореза в собственной модификации [5, 9, 17]. Суспензию эритроцитов (0,1%) помещали в 10 mM трис-HCl буфер (pH 7,4) и фиксировали перемещение клеток при силе тока 8 мА. Величину ЭФПЭ определяли по формуле: $U = S/TH$, где S — расстояние, на которое перемещались клетки, T — время перемещения клеток на расстояние S , H — градиент потенциала.

Это исследование проводилось в соответствии с принципами Базельской декларации и рекомендациями локального этического комитета Университетской клиники ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России.

Полученные данные были обработаны статистически в программном пакете

Statistica 6.0. Нормальность распределения значений параметров оценивали с использованием критерия Шапиро — Уилка. С учетом характера распределения признака для оценки статистической значимости различий применяли Н-критерий Краскела — Уоллеса.

Результаты исследования

В рамках первого этапа эксперимента, выполненного на образцах крови человека, установлено, что изучаемые экзогенные биорадикалы оказывают неодинаковое влияние на ЭФПЭ крови человека. Так, обе изучаемые АФК (озон и синглетный кислород) изменяют данный показатель, однако эти сдвиги разнонаправленны (рис. 1).

В частности, барботирование крови озоно-кислородной смесью с концентрацией озона 500 мкг/л, что соответствует низким терапевтическим дозам [14], инициирует существенное снижение значения параметра (на 22%; $p < 0,05$ по сравнению с контрольным образцом), тогда как обработка биологической жидкости синглетно-кислородной газовой смесью вызывает умеренное повышение уровня ЭФПЭ (на 13% относительно контроля; $p < 0,05$). Это обусловлено тем обстоятельством, что даже небольшие количества озона, введенные в биосреду, обеспечивают стимуляцию процессов липопероксидации [12, 14], приводя к структурным перестройкам мембраны эритроцитов и, следовательно, изменению их электрокинетических характеристик.

Напротив, показанное нами ранее в экспериментах *in vitro* [13] и *in vivo* [10] антиоксидантное действие синглетного кислорода способствует стабилизации эритроцитарных мембран и повышению их устойчивости, что, в свою очередь, способствует увеличению подвижности клеток крови в электрическом поле.

Оценка влияния различных концентраций оксида азота на электрокинетические свойства эритроцитов позволила установить, что данное воздействие вызывает

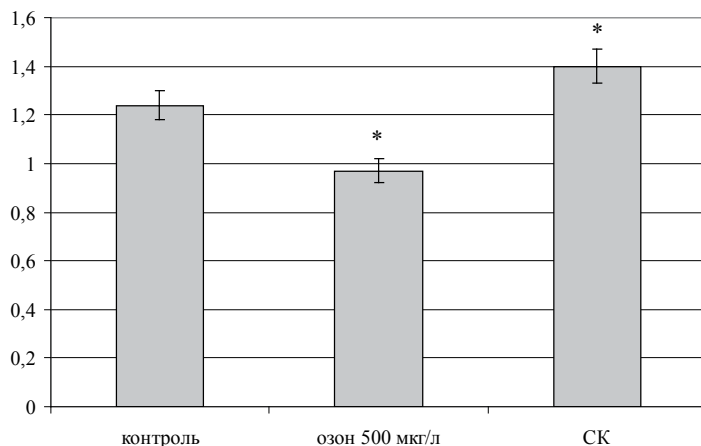


Рис. 1. Электрофоретическая подвижность эритроцитов ($\mu\text{м} \times \text{см} \times \text{В}^{-1} \times \text{с}^{-1}$) при действии активных форм кислорода (* — статистическая значимость различий по сравнению с контролем $p < 0,05$).

Fig. 1. Electrophoretic mobility of erythrocytes ($\mu\text{m} \times \text{cm} \times \text{B}^{-1} \times \text{s}^{-1}$) under the action of reactive oxygen species (* is the statistical significance of differences compared to the control $p < 0.05$).

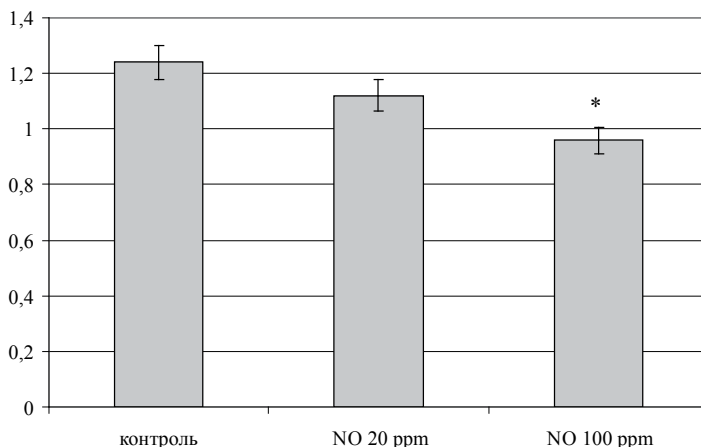


Рис. 2. Электрофоретическая подвижность эритроцитов ($\mu\text{м} \times \text{см} \times \text{В}^{-1} \times \text{с}^{-1}$) при действии оксида азота в различной концентрации (* — статистическая значимость различий по сравнению с контролем $p < 0,05$).

Fig. 2. Electrophoretic mobility of erythrocytes ($\mu\text{m} \times \text{cm} \times \text{B}^{-1} \times \text{s}^{-1}$) under the action of nitric oxide in various concentrations (* is the statistical significance of differences compared to the control $p < 0.05$).

дозозависимое снижение уровня ЭФПЭ (рис. 2). При этом, если при обработке крови относительно небольшим количеством NO (концентрация в газовой смеси — 20 ppm) эти сдвиги обнаруживаются лишь на уровне тенденции ($p < 0,1$ по сравнению с контрольным образцом), то при барботаже биологической жидкости более высокой концентрацией оксида азота (100 ppm) вы-

явлено снижение изучаемого параметра на 23% по отношению к контролю ($p < 0,05$). По нашему мнению, подобный характер ответа биосистемы на введение NO связан с тем, что небольшие количества последнего, утилизируясь в процессе реализации его биорегуляторной активности [2, 19, 24] и частично трансформируясь в депонирующие соединения (S-нитрозотиоды,

динитрозильные комплексы железа с высоко- и низкомолекулярными лигандами [21, 22, 24]), не включаются в свободнорадикальные процессы, протекающие в плазме и клетках крови.

С другой стороны, обработка биожидкости более высокой концентрацией NO обеспечивает условия для формирования его неутилизованного избытка, который способен трансформироваться в высокореактивные химические соединения, в частности пероксинитрит [23]. Обладая крайне высоким окислительным потенциалом, он может атаковать мембраны клеток крови, в том числе эритроцитов, потенцируя интенсивность свободнорадикальных процессов в них. Это, в свою очередь, приводит к изменению структуры эритроцитарных мембран и, как следствие, к сдвигам ЭФПЭ.

На втором этапе исследования изучали особенности модификации электрокинетических свойств мембран эритроцитов крыс при системном воздействии активных форм кислорода и оксида азота. Было установлено, что, как и в отношении непосредственной обработки крови источниками

радикалов, характер формируемых сдвигов ЭФПЭ определяется количеством и химическим составом воздействующих соединений. Так, при проведении ингаляций АФК выявлено, что озono-кислородная смесь и синглетный кислород разнонаправленно трансформируют изучаемый параметр (рис. 3). При этом проведение курса ингаляций озона способствует значительному снижению ЭФПЭ (на 30% относительно контрольной группы; $p < 0,01$), что согласуется с результатами эксперимента *in vitro*. Напротив, проведение ингаляций синглетного кислорода обеспечивает стимуляцию подвижности эритроцитов, причем использование полной мощности (100%) генератора данной активной формы кислорода приводило к достаточно существенному смещению уровня параметра (+13%; $p < 0,05$ по сравнению с интактными животными), тогда как при использовании 50% режима наблюдали сохранение физиологического уровня электрокинетической подвижности эритроцитов.

Также интересная динамика ответа была зафиксирована в отношении курсовых ингаляций различных концентраций

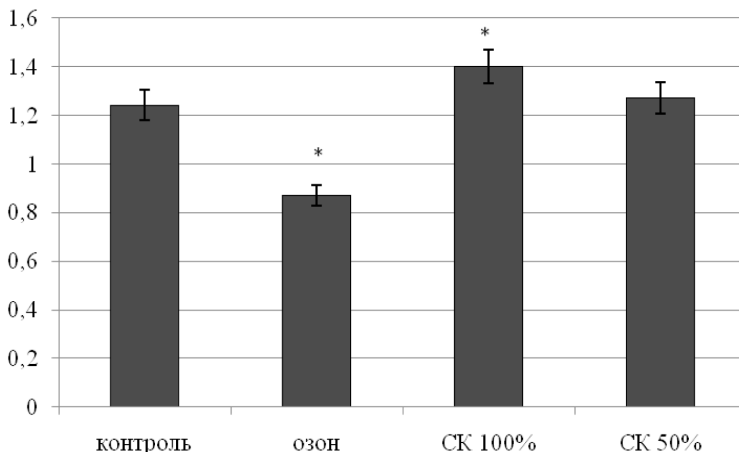


Рис. 3. Электрокинетические свойства эритроцитов крыс ($\mu\text{м} \times \text{см} \times \text{B}^{-1} \times \text{с}^{-1}$) при проведении ингаляций активных форм кислорода (СК — ингаляции синглетно-кислородной смеси; «*» — статистическая значимость различий по сравнению с контролем $p < 0,05$).

Fig. 3. Electrokinetic properties of rat erythrocytes ($\mu\text{m} \times \text{cm} \times \text{B}^{-1} \times \text{s}^{-1}$) during a course of inhalations with reactive oxygen species (СК — singlet oxygen inhalations; * is the statistical significance of differences compared to the control $p < 0.05$).

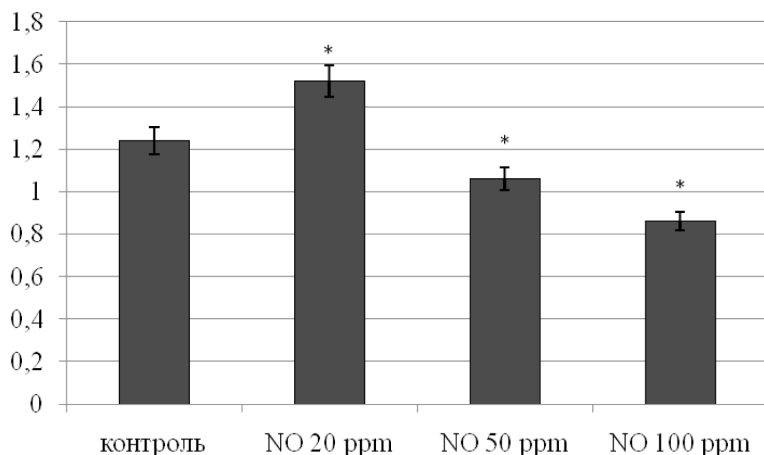


Рис. 4. Электрокинетические свойства эритроцитов крыс ($\mu\text{м} \times \text{см} \times \text{B}^{-1} \times \text{с}^{-1}$) при проведении ингаляций оксида азота (* — статистическая значимость различий по сравнению с контролем $p < 0,05$).

Fig. 4. Electrokinetic properties of rat erythrocytes ($\mu\text{m} \times \text{cm} \times \text{B}^{-1} \times \text{s}^{-1}$) during a course of inhalations with nitric oxide (* is the statistical significance of differences compared to the control $p < 0.05$).

NO (рис. 4). В частности, минимальная из примененных концентраций (20 ppm) обеспечивает нарастание значения показателя устойчивости мембран эритроцитов и их электрокинетической мобильности. В то же время применение газовой смеси с более высокими концентрациями (50 и 100 ppm) дозозависимо снижало ЭФПЭ (на 15 и 31% относительно интактных животных соответственно; $p < 0,05$ для обоих случаев). Это свидетельствует о двухфазности реакции мембран изучаемых клеток крови на курсовое ингаляционное применение данного оксида азота.

Обсуждение результатов

В настоящее время убедительно показана биорегуляторная роль малых молекул-радикалов [4, 8, 18], к числу которых относятся активные формы кислорода и монооксид азота [3, 6, 10, 15, 16]. С другой стороны, этот постулат касается преимущественно эндогенно генерируемых соединений [4, 15, 19], тогда как в отношении экзогенного их введения подобные сведения немногочисленны [1, 2, 21, 24]. В наших предшествующих работах было экспериментально показано, что эк-

зогенные источники кислород- и нитросодержащих радикалов способны изменять ряд метаболических параметров крови, включая индикаторы состояния окислительного и энергетического обмена, эритроцитарных ферментных систем детоксикации, как в условиях *in vitro* (на образцах крови) [5, 13], так и *in vivo* (у здоровых крыс популяции линий Wistar при ингаляционном и внутрибрюшинном введении) [11]. При этом продемонстрирован дифференцированный и дозозависимый характер ответа на воздействие данных физико-химических факторов. В частности, в этих исследованиях установлено модулирующее действие АФК и оксида азота на состояние мембран эритроцитов. Данный эффект был проиллюстрирован на примере динамики перекисной резистентности, характеризующей интенсивность процессов липопероксидации в эритроцитарных мембранах [11, 13].

Учитывая то обстоятельство, что ЭФПЭ в последние десятилетия рассматривается как интегральный параметр, позволяющий оценивать целостность и функциональные свойства мембран изучаемых клеток крови [10, 17, 23], представляло интерес уточнить

особенности сдвигов данного показателя в условиях влияния эндогенных источников радикалов и сопоставить его реализацию при непосредственной обработке крови и при системном применении фактора (в форме курса ингаляций).

Установлено, что среди изученных агентов наиболее неблагоприятным воздействием обладают ингаляции сухой озono-кислородной смеси и высокие концентрации оксида азота (100 ppm), которые существенно понижают электрокинетические свойства эритроцитов, что может быть обусловлено стимуляцией процессов липопероксидации в мембранах эритроцитов под влиянием данных источников радикалов. Напротив, синглетный кислород, для которого ранее нами показано выраженное антиоксидантное действие на биосистемы [10, 13, 22], способствует упрочнению липидного каркаса мембран, ингибируя процессы перекисного окисления липидов в последних. Аналогичный эффект прослеживается и в отношении низкой концентрации оксида азота (20 ppm), повышая мобильность рассматриваемых клеток крови в электрическом поле. Эти сдвиги ЭФПЭ, характерные для курсовых ингаляций синглетного кислорода и NO в концентрации 20 ppm, трактуются нами как благоприятные, проадаптивные. Приведенные результаты полностью подтверждают ранее продемонстрированное положительное действие указанных факторов на метаболические параметры крови, в частности, на состояние окислительного

и энергетического обмена, ферментных систем детоксикации и др. [10–13]. Это позволяет предположить, что одной из основных «точек приложения» экзогенных источников радикалов выступают свободнорадикальные процессы в мембранах эритроцитов, опосредующие биологические эффекты изучаемых соединений.

Заключение

На основании проведенных исследований обнаружен единый характер реагирования биосистем на непосредственное (при обработке крови) и опосредованное (в форме ингаляций) воздействие данных соединений в изучаемых условиях. Так, озono-кислородная смесь и высокие концентрации оксида азота (100 ppm) обеспечивают снижение электрофоретической подвижности эритроцитов. Напротив, более низкие дозы NO (20 ppm) и синглетный кислород оказывают стабилизирующее влияние на состояние мембран красных клеток крови, повышая антиоксидантный потенциал биосреды. Подобный эффект указанных факторов способствует стимуляции электрокинетических свойств эритроцитов в эксперименте *in vivo* (при курсовых ингаляциях). Таким образом показано, что экзогенные биорадикалы (активные формы кислорода и оксид азота) специфично и дозозависимо влияют на электрокинетические свойства эритроцитов в условиях *in vitro* и *in vivo*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ванин А.Ф., Чазов Е.И., Капелько В.И., Писаренко О.И., Шумаев К.Б., Максименко А.В., Руте Э.К., Тимошин А.А., Лакомкин В.Л., Цкишвили О.В., Серебрякова Л.И., Мох В.П. Участие активных форм кислорода в модуляции гипотензивного эффекта динитрозильных комплексов железа // Кардиологический вестник. — 2007. — № 2. — С. 31–37.
2. Власова М.А., Смирин Б.В., Покидышев Д.А., Машина С.Ю., Ванин А.Ф., Малышев И.Ю., Манухина Е.Б. Механизм адаптации сосудистой системы к хроническому изменению уровня оксида азота в организме // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2006. — № 12. — С. 626–630.
3. Граник В.Г., Григорьев Н.Б. Оксид азота (NO). Новый путь к поиску лекарств. — М.: Вузовская книга, 2004.
4. Гусакова С.В., Ковалев И.В., Смаглий Л.В., Бирулина Ю.Г., Носарев А.В., Петрова И.В., Медведев М.А., Орлов С.Н., Реутов В.П. Газовая сигнализация

- в клетках млекопитающих // Успехи физиологических наук. — 2015. — Т. 46, № 4. — С. 53–73.
5. Дерюгина А.В., Ошевенский Л.В., Таламанова М.Н., Цветков А.И., Шабалин М.А., Глявин М.Ю., Крылов В.Н. Изменение электрокинетических и биохимических характеристик эритроцитов при действии электромагнитных волн терагерцового диапазона // Биофизика. — 2017. — Т. 62, № 6. — С. 1108–1113.
 6. Заворотная Р.М. Синглетный кислород при лечении ряда патологических процессов: физико-химические аспекты // Украинский ревматологический журнал. — 2002. — № 1. — С. 35–37.
 7. Карелин В.И., Буранов С.Н., Пименов О.А. и др. Плазмохимическая установка для NO-терапии // Медиаль. — 2013. — № 4. — С. 46.
 8. Костюк В.А., Потапович А.И. Биорадикалы и биоантиоксиданты. — Минск: БГУ, 2004.
 9. Крылов В.Н., Дерюгина А.В., Плесскова С.Н. Электрофоретическая подвижность и морфометрия эритроцитов крыс при стрессовых воздействиях // Современные технологии в медицине. — 2010. — № 4. — С. 23–26.
 10. Мартусевич А.А., Перетягин С.П., Мартусевич А.К. Молекулярные и клеточные механизмы действия синглетного кислорода на биосистемы // Современные технологии в медицине. — 2012. — № 2. — С. 128–134.
 11. Мартусевич А.К., Соловьева А.Г., Ашихмин С.П., Перетягин С.П. Влияние ингаляций оксида азота на состояние окислительного и энергетического метаболизма крови крыс // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. — 2015. — Т. 101, № 2. — С. 180–188.
 12. Мартусевич А.К., Соловьева А.Г., Перетягин С.П. Влияние свободного и депонированного оксида азота на энергетический метаболизм крови // Современные технологии в медицине. — 2013. — Т. 5, № 4. — С. 33–38.
 13. Мартусевич А.К., Соловьева А.Г., Перетягин С.П., Митрофанов В.Н. Оценка влияния некоторых физических факторов на энергетический метаболизм крови in vitro // Биомедицина. — 2013. — № 1. — С. 103–108.
 14. Перетягин С.П., Стручков А.А., Мартусевич А.К., Костина О.В., Лузан А.С. Применение озона как средства детоксикации в раннем периоде ожоговой болезни // Скорая медицинская помощь. — 2011. — Т. 12, № 3. — С. 39–43.
 15. Реутов В.П., Охотин В.Е., Шуклин А.В. Оксид азота (NO) и цикл NO в миокарде: молекулярные, биохимические и физиологические аспекты // Успехи физиологических наук. — 2007. — Т. 38, № 4. — С. 39–58.
 16. Самосюк И.З., Фисенко Л.И. (ред.) Синглетно-кислородная терапия. — Киев, 2007.
 17. Симутис И.С. Дерюгина А.В., Бояринов Г.А. и др. Изменение электрофоретической подвижности и формы эритроцитов при действии озона на эритроцитарную массу // Медиаль. — 2013. — № 4. — С. 20–21.
 18. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. Free radicals in biology and medicine. — Oxford, UK: Oxford University Press, 1999.
 19. Ignarro L.J., Buga G.M., Wood K.S., Byrns R.E., Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1987. — Vol. 84. — P. 9265–9269.
 20. Nihei Y., Asai H., Ukai T., Marimoto H., Nakajima Y., Hanajiri T., Maekawa T. Detection of surface immunoreactions on individual cells by electrophoretic mobility measurement in a micro-channel // Sensors and actuators. — 2008. — Vol. 131. — P. 285–289.
 21. Shumakov K.B., Gubkin A.A., Serezhnikov V.A., et al. Interaction of reactive oxygen and nitrogen species with albumin- and hemoglobin bound dinitrosyl iron complexes // Nitric Oxide Biol. Chem. — 2008. — Vol. 18. — P. 37–46.
 22. Titov V.Yu., Ivanova A.V., Petrov V.A., Serezhnikov V.A., Mikoyan V.D., Vanin A.F., Osipov A.N. Can Summary Nitrite+Nitrate Content Serve as an Indicator of NO Synthesis Intensity in Body Tissues? // Bull. Exp. Biol. Med. — 2012. — Vol. 153, No. 6. — P. 840–843.
 23. van der Vliet A., Eiserich J.P., Halliwell B., Cross C.E. Formation of reactive nitrogen species during peroxidase-catalyzed oxidation of nitrite. A potential additional mechanism of nitric oxide-dependent toxicity // J. Biol. Chem. — 1997. — Vol. 272. — P. 7617–7625.
 24. Vanin A.F. Dinitrosyl-iron complexes with thiolate ligands: physico-chemistry, biochemistry and physiology // Nitric Oxide Biol. Chem. — 2009. — Vol. 21. — P. 136–149.
 25. Xie L., Sun D., Yao W., Wen Z. Microrheological characteristics of reticulocyte in vivo // Science in China. — 2002. — Vol. 45, No. 1. — P. 50–55.

REFERENCES

1. Vanin A.F., Chazov E.I., Kapel'ko V.I., Pisarenko O.I., Shumakov K.B., Maksimenko A.V., Ruuge E.H.K., Timoshin A.A., Lakomkin V.L., Kkitishvili O.V., Serebryakova L.I., Moh V.P. Uchastie aktivnykh form kisloroda v modul'yacii gipotenzivnogo ehffekta dinitrozil'nykh kompleksov zheleza [Role of reactive oxygen species in modulation of hypotensive effect of dinitrosyl iron complexes]. Kardiologicheskij vestnik [Cardiol. Herald]. 2007. No. 2. Pp. 31–37. (In Russian).
2. Vlasova M.A., Smirin B.V., Pokidyshev D.A., Mashina S.Yu., Vanin A.F., Malyshev I.Yu., Manuhina E.B. Mekhanizm adaptacii sosudistoj sistemy k

- hronicheskomu izmeneniyu urovnya oksida azota v organizme [Mechanism of adaptation of cardiovascular system to chronic shift of nitric oxide level in organism]. Byulleten' ehksperimental'noj biologii i mediciny [Bull. Exp. Biol. and Med.]. 2006. V. 12. Pp. 626–630. (In Russian).
3. Granik V.G., Grigor'ev N.B. Oksid azota (NO). Novyy put' k poisku lekarstv [Nitric oxide (NO). New way to drug discovery]. Moscow: Vuzovskaya kniga, 2004. (In Russian).
 4. Gusakova S.V., Kovalev I.V., Smaglij L.V., Birulina Yu.G., Nosarev A.V., Petrova I.V., Medvedev M.A., Orlov S.N., Reutov V.P. Gazovaya signalizaciya v kletkah mlekopitayushchih [Gas signaling in mammalian cells]. Uspekhi fiziologicheskikh nauk [Advances in physiological sciences]. 2015. V. 46, No. 4. Pp. 53–73. (In Russian).
 5. Deryugina A.V., Oshevenskiy L.V., Talamanova M.N., Cvetkov A.I., Shabalin M.A., Glyavin M.Yu., Krylov V.N. Izmenenie ehlektrokineticheskikh i biohimicheskikh harakteristik ehritroцитов pri dejstvii ehlektromagnitnykh voln teragercovogo diapazona [Changes of electrokinetic and biochemical characteristics of erythrocytes under action of electromagnetic waves of terahertz mode]. Biophysics. 2017. V. 62, No. 6. Pp. 1108–1113. (In Russian).
 6. Zavorotnaya R.M. Singletnyj kislorod pri lechenii ryada patologicheskikh processov: fiziko-himicheskie aspekty [Singlet oxygen in treatment of some pathological processes: physical and chemical aspects]. Ukrainiyi revmatologicheskij zhurnal [Ukrainian Rheumatology J.]. 2002. No. 1. Pp. 35–37. (In Russian).
 7. Karelin V.I., Buranov S.N., Pimenov O.A., et al. Plazmo-himicheskaya ustanovka dlya NO-terapii [Plasma chemical device for NO-therapy]. Medial. 2013. No. 4. P. 46. (In Russian).
 8. Kostyuk V.A., Potapovich A.I. Bioradikaly i bioantioksidanty [Bioadicals and antioxidants]. Minsk: BGU, 2004. (In Russian).
 9. Krylov V.N., Deryugina A.V., Pleskova S.N. Ehlektroforeticheskaya podvizhnost i morfometriya ehritroцитов krys pri stressovykh vozdeystviyakh [Electrophoretic motility and morphometry of rats erythrocytes under stress conditions]. Sovremennyye tekhnologii v medicine [Modern technology in medicine]. 2010. No. 4. Pp. 23–26. (In Russian).
 10. Martusevich A.A., Peretyagin S.P., Martusevich A.K. Molekulyarnyye i kletochnyye mekhanizmy dejstviya singletnogo kisloroda na biosistemy [Molecular and cellular mechanism of the action of singlet oxygen on biological systems]. Sovremennyye tekhnologii v medicine [Modern technology in medicine]. 2012. No. 2. Pp. 128–134. (In Russian).
 11. Martusevich A.K., Solov'eva A.G., Ashikhmin S.P., Peretyagin S.P. Vliyaniye ingalyacij oksida azota na sostoyaniye okislitel'nogo i ehnergeticheskogo metabolisma krovi krys [The influence of nitric oxide inhalations on the state of oxidative and energy metabolism in rats blood]. Ros. fiziol. zhurn. im. I.M. Sechenova [Russ. J. of Physiol. Russian named after I.M. Sechenov]. 2015. V. 101, No. 2. Pp. 180–188. (In Russian).
 12. Martusevich A.K., Solov'eva A.G., Peretyagin S.P. Vliyaniye svobodnogo i deponirovannogo oksida azota na ehnergeticheskij metabolism krovi [The influence of bound nitric oxide on blood energy metabolism. Sovremennyye tekhnologii v medicine [Modern technology in medicine]. 2013. V. 5. No. 4. Pp. 33–38. (In Russian).
 13. Martusevich A.K., Solov'eva A.G., Peretyagin S.P., Mitrofanov V.N. Ocenka vliyaniya nekotorykh fizicheskikh faktorov na ehnergeticheskij metabolism krovi in vitro [Estimation of the influence of some physical factors on blood energy metabolism in vitro]. Biomedicine. 2013. No. 1. Pp. 103–108. (In Russian).
 14. Peretyagin S.P., Struchkov A.A., Martusevich A.K., Kostina O.V., Luzan A.S. Primeneniye ozona kak sredstva detoksikatsii v rannem periode ozhogovoy bolezni [Use of the ozone as a detoxication remedy in early period of burn disease]. Skoraya meditsinskaya pomoshch [Emergency]. 2011. V. 12, No. 3. Pp. 39–43. (In Russian).
 15. Reutov V.P., Ohotin V.E., Shuklin A.V. Oksid azota NO i tsikl NO v miokarde: molekulyarnyye, biohimicheskie i fiziologicheskie aspekty [Nitric oxide (NO) and NO cycle in the myocardium: molecular, biochemical and physiological aspects]. Uspekhi fiziologicheskikh nauk [Advances in physiological sciences]. 2007. V. 38, No. 4. Pp. 39–58. (In Russian).
 16. Samosyuk I.Z., Fisenko L.I. (edited). Singletno-kislorodnaya terapiya [Singlet-oxygen therapy]. Kiev, 2007. (In Russian).
 17. Simutis I.S., Deriugina A.V., Boyarinov G.A., et al. Izmeneniye ehlektroforeticheskoy podvizhnosti i formy ehritroцитов pri dejstvii ozona na ehritroцитarnuyu massu [Changes of electrophoretic motility and share of erythrocytes under ozone action on erythrocyte mass]. Medial. 2013. No. 4. Pp. 20–21. (In Russian).
 18. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. Free radicals in biology and medicine. Oxford, UK: Oxford University Press, 1999.
 19. Ignarro L.J., Buga G.M., Wood K.S., Byrns R.E., Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. Pp. 9265–9269.
 20. Nihei Y., Asai H., Ukai T., Marimoto H., Nakajima Y., Hanajiri T., Maekawa T. Detection of surface immunoreactions on individual cells by electrophoretic mobility measurement in a micro-channel. Sensors and actuators. 2008. V. 131. Pp. 285–289.
 21. Shumaev K.B., Gubkin A.A., Serezhnikov V.A., et al. Interaction of reactive oxygen and nitrogen species with albumin- and hemoglobin bound dinitrosyl iron complexes. Nitric Oxide Biol. Chem. 2008. V. 18. Pp. 37–46.

22. Titov V.Yu., Ivanova A.V., Petrov V.A., Serezhenkov V.A., Mikoyan V.D., Vanin A.F., Osipov A.N. Can Summary Nitrite+Nitrate Content Serve as an Indicator of NO Synthesis Intensity in Body Tissues? Bull. Exp. Biol. Med. 2012. V. 153. No. 6. Pp. 840–843.
23. van der Vliet A., Eiserich J.P., Halliwell B., Cross C.E. Formation of reactive nitrogen species during peroxidase-catalyzed oxidation of nitrite. A potential additional mechanism of nitric oxide-dependent toxicity. J. Biol. Chem. 1997. V. 272. Pp. 7617–7625.
24. Vanin A.F. Dinitrosyl-iron complexes with thiolate ligands: physico-chemistry, biochemistry and physiology. Nitric Oxide Biol. Chem. 2009. V. 21. Pp. 136–149.
25. Xie L., Sun D., Yao W., Wen Z. Microrheological characteristics of reticulocyte in vivo. Science in China. 2002. V. 45. No. 1. Pp. 50–55.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Мартусевич Андрей Кимович*, д.б.н., Университетская клиника ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России; зав. лаб. биокристалломики и свободнорадикальной медицины, ФГБОУ ВО «Кировский государственный медицинский университет» Минздрава России; ученый секретарь, Ассоциация российских озонотерапевтов; e-mail: cryst-mart@yandex.ru

Andrey K. Martusevich*, Dr. Sci. (Biology), University Clinic of the Privolzhsky Research Medical University; Head of Laboratory of Biocrystallography and Free Radical Medicine, Kirov State Medical University; Scientific Secretary, Russian Association of Ozone Therapy; e-mail: cryst-mart@yandex.ru

Мартусевич Анастасия Анатольевна, Институт биологии и биомедицины ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»; Ассоциация российских озонотерапевтов

Anastasiia A. Martusevich, Institute of Biology and Biomedicine of the Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod; Russian Association of Ozone Therapy

Дерюгина Анна Вячеславовна, д.б.н., доц., Институт биологии и биомедицины ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»

Anna V. Deriugina, Dr. Sci. (Biology), Associate Professor, Institute of Biology and Biomedicine of the Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod

Перетягин Сергей Петрович, д.м.н., проф., Ассоциация российских озонотерапевтов

Sergey P. Peretyagin, Dr. Sci. (Med.), Professor, Russian Association of Ozone Therapy

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

Лабораторкорм

*Более десяти лет коллектив нашей организации обеспечивает высококачественным **комбикормом для лабораторных животных** научные медицинские и учебные учреждения России.*

Реализуем:

- ✓ Оборудование для вивариев (клетки-стеллажи и др.);
- ✓ Подстилочный материал из древесной стружки;
- ✓ Зерно: пшеница, овес, ячмень,
- ✓ Премиксы.

НАШИ КОРМА
полнорационные,
сбалансированные по
аминокислотному составу,
минералам и витаминам



Доставка в любой регион России

Наш адрес: Москва, 2-й Вязовский проезд, д. 16, стр. 10

ООО «Лабораторкорм»

Телефоны: (495) 972-99-72, 972-16-87, 220-01-23

www.laboratorkorm.ru

ЛАБОРАТОРИЯ НЕЙРОТЕХНОЛОГИЙ ФГБУН НЦБМТ ФМБА РОССИИ

В лаборатории нейротехнологий (зав. лаб. – к.б.н. Фокин Юрий Владимирович) выполняются исследования активности мозга, поведенческих, когнитивных и коммуникативных функций животных, выносливости и работоспособности, параметров резистентности к условиям внешней среды с применением современного высокотехнологичного оборудования, что позволяет создавать новые и оптимизировать существующие биомедицинские методы, тестировать биологически активные и фармакологические средства в доклинических исследованиях.

Задачи лаборатории:

- Изучение активности, функций и интрацентральных отношений головного мозга, в т.ч. по параметрам электрограмм, вызванным потенциалам, пороговым величинам чувствительности к различным применяемым воздействиям, включая транскраниальную стимуляцию.
- Анализ эффектов центрального генеза посредством регистрации периферического действия исследуемых средств с помощью кардиографии, термометрии, пульсоксиметрии и других методов функциональной диагностики.
- Регистрация и интерпретация параметров системного поведения и ультразвуковой вокализации лабораторных животных, отражающих их коммуникативные функции и являющихся индикаторами психоэмоционального состояния, в заданных условиях и при действии тестируемых веществ.
- Исследование когнитивных функций (внимания, памяти, обучения и др.), выносливости и работоспособности животных в классических биомедицинских тестах (бега, плавания и т.д.) и при воздействии экстремальных факторов (электростимуляция, температура и проч.) окружающей среды.

