

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

ISSN 2074-5982 (print)

БИОМЕДИЦИНА

SCIENTIFIC JOURNAL

JOURNAL BIOMED

Том (Vol.) 17

2021

1



Верхом на буре



Исторический опыт показывает, что, как ни странно, прорывы в научно-техническом прогрессе зачастую свершаются в период мировых катастроф и войн. Буря ковидной пандемии мобилизовала исследователей всего мира на поиск средств борьбы с ее последствиями. Пандемия COVID-19 обнажила связи между состоянием здоровья и социальным и экономическим неравенством. По данным Международного валютного фонда (МВФ), пандемия привела

к ухудшению уровня жизни практически во всех странах мира.

2020 год выдался непростым и для редколлегии журнала «Биомедицина». Изменились условия жизни, многие перешли на дистанционные условия работы, и даже традиционную научно-практическую конференцию НЦБМТ ФМБА России пришлось проводить в удалённом режиме. Интернет заменил радость непосредственного общения, обмена опытом, дискуссий. Но эти условия заставили всех нас стать более собранными, сплотиться в борьбе с коронавирусной инфекцией. Наряду с традиционными публикациями в предшествующих номерах, в третьем номере журнала были представлены статьи по результатам заочной научно-практической конференции «Биомедицина и биомоделирование». Опубликованы более 20 лучших из представленных на конференцию работ.

Четвёртый же выпуск стал тематическим, направленным на ликвидацию ковидных «бурь» и «штормов». Статьи этого номера отразили работу сотрудников Научного центра биомедицинских технологий по знаковым исследованиям COVID-зависимых пневмоний и сопряженных поражений организма. Эти работы являются революционными по взглядам на фундаментальные механизмы «цитокинового шторма», острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) и других жизненно опасных состояний. Расшифровка механизмов «цитокинового шторма» стоит особенно остро в связи с грозными, зачастую с несовместимыми с жизнью, осложнениями коронавирусной инфекции.

Учёным НЦБМТ ФМБА России удалось открыть новые подходы к подавлению «цитокинового шторма», основанные на функционировании опиоид-эргической системы иммунных клеток. Была создана фатальная биомодель ОРДС, воспроизводящая существенные признаки «цитокинового шторма» при COVID-19 и другие проявления коронавирусной «бури».

Установлено, что секста-пептид Лейтрагин является преимущественным агонистом периферических дельта-опиоидных рецепторов. Вследствие этого механизма при ингаляционном внутрилёгочном введении эффективно подавляет экспрессию таких провоспалительных цитокинов, как интерлейкины ИЛ-1 и ИЛ-6. Лейтрагин также ингибирует экспрессию фактора некроза опухоли (ФНО- α). Подавляя экспрессию цитокинов в легких, Лейтрагин предельно снижает гибель животных от ОРДС.



Фундаментальная и клиническая значимость этих работ состоит в том, что, во-первых, установлена новая перспективная терапевтическая мишень. Во-вторых, найден новый класс соединений для лечения «цитокинового шторма». В-третьих, пионерское значение этих работ заключается в том, что при ОРДС-патологиях пока не существует адекватной терапии. В-четвёртых, этот подход хоть и лежит в русле современной анти-цитокиновой терапии (например, антителами к провоспалительным цитокинам и их рецепторам), но обладает существенной новизной. И она заключается в том, что Лейтрагин тотально подавляет экспрессию целого ряда цитокинов, тогда как антитела действуют выборочно на отдельные цитокины.

В этом контексте эффекты Лейтрагина наиболее соответствуют реальной ситуации подавления «цитокинового шторма», когда повышение уровня множества цитокинов одномоментно сопряжено с вовлечением и других провоспалительных факторов, кодируемых ядерным фактором NF κ B. Принципиально важно, что Лейтрагин абсолютно снижает гибель животных в модели ОРДС, тогда как моноклональные антитела к рецептору ИЛ-6 в этой же модели не обладают таким действием.



Фармакоэкономические показатели также очень важны и должны учитываться при оценке и внедрении нового лекарственного средства «Лейтрагин». Будучи коротким пептидом, Лейтрагин имеет существенно меньшую себестоимость, чем терапевтические антитела, что расширяет возможности его массового применения в условиях пандемии, особенно

в странах с низким уровнем доходов населения. Это особенно важно, так как к концу 2021 года, по данным МВФ, в абсолютной бедности будут жить на 150 млн человек больше, чем ожидалось ранее.

Можно предположить, что Лейтрагин будет эффективен в лечении многих хронических лёгочных заболеваний, этиология которых включает повышенную продукцию провоспалительных цитокинов, хотя и не такую высокую, как при «цитокиновом шторме». К таким заболеваниям относятся хроническая обструктивная болезнь лёгких, бронхиальная астма, фиброзирующие поражения лёгких.

В 2021 году мы планируем публиковать статьи по инновационной и традиционной для нас тематике. Мы сохраняем свои позиции по бесплатным публикациям в журнале. Авторы будут также безвозмездно получать экземпляр журнала со своей статьёй.

Статьи журнала «Биомедицина», входящего в ядро РИНЦ, цитируются в международных базах данных SCOPUS, Web of Science, Medline и др. В журнале опубликованы статьи авторов из **185** организаций, каждой статье присваивается префикс **doi**. Публикации журнала были процитированы в **668** изданиях и **558** учреждениях. Двухлетний импакт-фактор РИНЦ журнала с учетом цитирования из всех источников составил **0,833**, а пятилетний импакт-фактор — 0,476. Средний индекс Хирша авторов вырос с 6,9 до **7,4**, время полужизни статей за последние 5 лет увеличилось в **два раза**.

Мы надеемся на дальнейшее плодотворное сотрудничество и благодарны всем авторам, присылающим статьи в наш журнал. Приглашаем всех на нашу ежегодную научно-практическую конференцию «Биомедицина и биомоделирование», которая традиционно планируется на конец мая 2021 года. Лучшие из работ также будут опубликованы в нашем журнале. Приоритетными будем считать те работы, тематика которых направлена на ликвидацию коронавирусных «бурь» и «штормов».

*Главный редактор, член-корреспондент РАН,
академик РАРАН, академик МАА,
доктор медицинских наук, профессор Н.Н. Каркищенко*

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

БИОМЕДИЦИНА

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Издается с 2005 г.
4 выпуска в год

2021, Том 17, № 1

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

JOURNAL BIOMED

SCIENTIFIC JOURNAL

Published since 2005.
Quarterly.

2021, Vol. 17, No. 1

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

■ Главный редактор

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

■ Заместители главного редактора

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

Помыткин Игорь Анатольевич, к.х.н.

■ Ответственный секретарь

Алимкина Оксана Владимировна

■ Члены редакционного совета

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

БИОМЕДИЦИНА

Biomeditsina

История издания журнала:	Журнал издается с 2005 г.
Периодичность:	4 выпуска в год
Префикс DOI:	10.33647
ISSN	2074-5982 (Print)
Свидетельство о регистрации СМИ:	Журнал зарегистрирован Комитетом РФ по печати. Свидетельство о регистрации: ПИ № ФС77-21324 от 09.06.2005
Индексация:	Журнал включен в Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук
Подписной индекс:	57995 в каталоге «Издания органов научно-технической информации» ОАО «Роспечать»
Стоимость одного выпуска:	400 руб.
Условия распространения материалов:	Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0 License
Учредитель:	ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России» 143442, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, влд. 1
Издатель:	ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России» 143442, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, влд. 1
Редакция:	143442, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, влд. 1 Тел.: +7 (495) 561-52-64 E-mail: info@scbmt.ru , scbmt@yandex.ru
Тираж:	3000 экземпляров
Типография:	ООО «БЕАН» 603003, Нижегородская обл., Нижний Новгород, ул. Баррикад, 1
Дата выхода в свет:	10.03.2021

JOURNAL BIOMED

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

■ Editor-in-Chief

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

■ Deputy Editors-in-Chief

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

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

■ Executive Secretary

Oksana V. Alimkina

■ Members of Editorial Council

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

JOURNAL BIOMED

Founded:	The journal has been published since 2005.
Frequency:	Quarterly
DOI Prefix:	10.33647
ISSN	2074-5982 (Print)
Mass media registration certificate:	Registered at the State Committee of the Russian Federation on Press under the number ПИ № ФС77-21324 of 09.06.2005
Indexing:	The Journal is included into the Higher Attestation Commission (HAC) list of periodicals (the list of leading per-reviewed scientific journals recommended for publishing the basic research results of doctor and candidate theses)
Subscription index:	57995 in the catalogue "Izdaniya organov nauchno-tehnicheskoy informatsii" of the Rospechat agency
Price:	400 RUR
Content distribution terms:	Content is distributed under Creative Commons Attribution 4.0 License
Founders:	Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia 143442, Russian Federation, Moscow Region, Krasnogorsk District, Svetlye Gory Village, building 1
Publisher:	Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia 143442, Russian Federation, Moscow Region, Krasnogorsk District, Svetlye Gory Village, building 1
Editorial office:	143442, Russian Federation, Moscow Region, Krasnogorsk District, Svetlye Gory Village, building 1 Tel.: +7 (495) 561-52-64 E-mail: info@scbmt.ru , scbmt@yandex.ru
Circulation:	3000 copies
Printing house:	BEAN, LLC. 603003, Russian Federation, Nizhny Novgorod Region, Nizhny Novgorod, Barrikad Street, 1
Publication date:	10.03.2021

■ ГЕНЕТИКА И ЭПИГЕНЕТИКА ЖИВОТНЫХ-БИОМОДЕЛЕЙ

**В.Н. Каркищенко, Н.В. Петрова, Е.С. Савченко, Н.С. Огнева, Е.М. Колоскова,
С.В. Максименко, В.А. Манувера, П.А. Бобровский, В.Н. Лазарев**

Создание полных гибридных ДНК-конструкций
с геном человека HLA-A*02:01:01:01 10

■ МЕТОДЫ И ТЕХНОЛОГИИ БИОМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

М.М. Борисова, М.А. Чечушков, Л.А. Таболякова

Фитотерапевтическая и фармакологическая тактика профилактики
и лечения кабарги как животных-продуцентов высококачественного мускуса 24

Е.И. Бонь, Н.Е. Максимович

Структурно-функциональная характеристика ионных каналов
и методы исследования их активности 35

С.Н. Субботина, М.А. Юдин, А.А. Парфёнова, А.А. Кряжевских, А.Б. Орлова

Влияние нейропептидов — дельта-сон-индуцирующего пептида,
кисспептина-10 и РТ-141 — на половое поведение самцов крыс. 43

Е.Б. Шустов, Ю.В. Фокин, С.Л. Люблинский, О.В. Алимкина, А.Е. Ким,

Д.Ю. Ивкин, Е.Л. Матвеев, А.С. Ивкина, Г.А. Плиско, М.А. Поверяева

Фармакологическая коррекция переносимости одновременного гипоксического
и температурного воздействия на функциональное состояние организма 57

■ РЕЛЕВАНТНОЕ И АЛЬТЕРНАТИВНОЕ БИОМОДЕЛИРОВАНИЕ

С.С. Байгильдин, Л.А. Мусина, З.Р. Хисматуллина

Генетические и индуцированные модели животных с дегенерацией сетчатки. 70

Г.В. Жукова, А.И. Шихлярова, Т.П. Протасова, Е.А. Лукбанова, Е.В. Заикина,

А.В. Волкова, Д.В. Ходакова

Особенности влияния хронического воспаления, индуцированного формалином,
на развитие опухоли и продолжительность жизни белых беспородных крыс 82

■ GENETICS AND EPIGENETICS OF ANIMALS-BIOMODELS

- Vladislav N. Karkischenko, Nataliya V. Petrova, Elena S. Savchenko, Nastasya S. Ogneva, Elena M. Koloskova, Sergey V. Maksimenko, Valentin A. Manuvera, Pavel A. Bobrovsky, Vassili N. Lazarev**
Chimeric Construct Engineering with Human Variant 10

■ BIOMEDICAL METHODS AND TECHNOLOGIES

- Mariya M. Borisova, Mikhail A. Chechushkov, Lidiya A. Taboyakova**
Phytotherapeutic and Drug Prophylaxis and Treatment in Musk Deer,
an Animal Source of High-Quality Musk 24

- Elizaveta I. Bon, Nataliya Ye. Maksimovich**
Structural and Functional Characteristics of Ion Channels and Methods
for Investigating their Activity. 35

- Svetlana N. Subbotina, Mikhail A. Yudin, Anastasiya A. Parfyonova, Aleksey A. Kryazhevskikh, Anastasiya B. Orlova**
Effects of Delta-Sleep-Inducing, Kisspeptin-10 and Pt-141 Neuropeptides
on Sexual Behaviour in Male Rats 43

- Evgeny B. Shustov, Yuriy V. Fokin, Stanislav L. Lyublinskiy, Oksana V. Alimkina, Aleksey E. Kim, Dmitry Yu. Ivkin, Elena L. Matveyenko, Arina S. Ivkina, Grigory A. Plisko, Marina A. Poveryaeva**
Drug Correction of Hypoxic Thermal Impact on Organismal Functional State 57

■ RELEVANT AND ALTERNATIVE BIOMODELING

- Samat S. Baygildin, Lyalya A. Musina, Zukhra R. Khismatullina**
Experimental Animal Models of Retinal Degeneration. 70

- Galina V. Zhukova, Alla I. Shikhlyarova, Tatiana P. Protasova, Ekaterina A. Lukbanova, Ekaterina V. Zaikina, Anastasiya V. Volkova, Darya V. Khodakova**
Features of the Influence of Chronic Formalin-Induced Inflammation
on Tumor Development and Lifespan of White Outbred Rats 82

СОЗДАНИЕ ПОЛНЫХ ГИБРИДНЫХ ДНК-КОНСТРУКЦИЙ С ГЕНОМ ЧЕЛОВЕКА HLA-A*02:01:01:01

В.Н. Каркищенко¹, Н.В. Петрова^{1,*}, Е.С. Савченко¹, Н.С. Огнева¹, Е.М. Колоскова²,
С.В. Максименко¹, В.А. Манувера³, П.А. Бобровский³, В.Н. Лазарев³

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

² Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии
и питания животных — филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства —
ВИЖ им. акад. Л.К. Эрнста»

249013, Российская Федерация, Калужская обл., Боровск, п. Институт

³ ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА России»
119435, Российская Федерация, Москва, Малая Пироговская ул., 1а

Борьба с фатальными острыми поражениями легких, острым респираторным дистресс-синдромом (ОРДС), «цитокиновым штормом», возникающими при тяжелой интерстициальной патологии, в т. ч. COVID-19, требует быстрого получения и внедрения новых препаратов, биомедицинских технологий лечения. Это, в свою очередь, ставит исследователей перед задачей разработки адекватных биомodelей для доклинических исследований. Существующие генетические отличия у представителей разных этнических групп населения оказывают влияние на механизм и эффективность лекарственных препаратов. Биомodelи, учитывающие особенности генетического полиморфизма конкретных популяций, позволяют полнее исследовать молекулярно-генетические механизмы действия фармакологических средств, включая иммунобиологические. Созданная генно-инженерная конструкция кодирует гибридную молекулу класса I МНС и содержит β_2 -микроглобулин человека, фрагменты ($\alpha 1$ -и $\alpha 2$ -домены) гена HLA-A*02:01:01:01, который характерен для русского человека, и $\alpha 3$ домен H2-K комплекса мыши. Линейный фрагмент из ДНК-конструкции будет в дальнейшем использован для получения линии гуманизированных трансгенных мышей.

Ключевые слова: генно-инженерная конструкция, HLA-A*02:01:01:01 русского человека, трансгенноз, гуманизированные трансгенные мыши

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности: авторы выражают искреннюю благодарность сотрудникам лаборатории трансплантационной иммунологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» и её заведующему Ефимову Григорию Александровичу за помощь в отборе доноров и предоставлении образцов плазмы крови.

Для цитирования: Каркищенко В.Н., Петрова Н.В., Савченко Е.С., Огнева Н.С., Колоскова Е.М., Максименко С.В., Манувера В.А., Бобровский П.А., Лазарев В.Н. Создание полных гибридных ДНК-конструкций с геном человека HLA-A*02:01:01:01. *Биомедицина*. 2021;17(1):10–23. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-1-10-23>

Поступила 02.11.2020

Принята после доработки 22.01.2021

Опубликована 10.03.2021

CHIMERIC CONSTRUCT ENGINEERING WITH HUMAN VARIANT HLA-A*02:01:01:01

Vladislav N. Karkischenko¹, Nataliya V. Petrova^{1,*}, Elena S. Savchenko¹,
Nastasya S. Ogneva¹, Elena M. Koloskova², Sergey V. Maksimenko¹,
Valentin A. Manuvera³, Pavel A. Bobrovsky³, Vassili N. Lazarev³

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

² All-Russian Research Institute of Physiology, Biochemistry and Animal Nutrition —
branch of the Federal Scientific Centre of Animal Husbandry — All-Russian Institute of Animal Husbandry
named after acad. L.K. Ernst
249013, Russian Federation, Kaluga Region, Borovsk, Institut Settlement

³ Federal Research and Clinical Centre of Physical-Chemical Medicine of the Federal Medical
and Biological Agency of Russia
119435, Russian Federation, Moscow, Malaya Pirogovskaya Street, 1a

The containment of lethal acute lung injuries, acute respiratory distress syndrome (ARDS) and cytokine storm arising from severe interstitial pathology, including COVID-19, requires an efficient design and therapeutic implementation of new drugs and biomedical technologies. This demand calls for adequate biomodels in preclinical research and trial. Genetic variations between ethnic groups condition the specific mechanisms of drug efficiency. Modelling this population-specific genetic polymorphism allows a comprehensive research into the molecular bases of pharmacological action, also in immune biology. The engineered chimeric molecule encodes a MHC class I product that combines human β_2 -microglobulin, the α_1 and α_2 domains of Russian ethnic allelic variant HLA-A*02:01:01:01 and murine H2-K complex α_3 domain. The linear chimeric gene fragment will be used to obtain humanised lineages of transgenic mice.

Keywords: genetically engineered construct, Russian ethnic variant HLA-A*02:01:01:01, transgenesis, humanised transgenic mice

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

Acknowledgements: the authors are sincerely grateful to staff of the Laboratory of Transplant Immunology at the National Medical Research Centre of Haematology and head of laboratory Efimov Grigory Alexandrovich for assistance in donor selection and provision of blood plasma samples.

For citation: Karkischenko V.N., Petrova N.V., Savchenko E.S., Ogneva N.S., Koloskova E.M., Maksimenko S.V., Manuvera V.A., Bobrovsky P.A., Lazarev V.N. Chimeric Construct Engineering with Human Variant HLA-A*02:01:01:01. *Journal Biomed.* 2021;17(1):10–23. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-1-10-23>

Submitted 02.11.2020

Revised 22.01.2021

Published 10.03.2021

Введение

Современные биомедицинские тенденции требуют оценки не только химико-и фармакодинамики, а также соответствующих кинетических параметров и констант, но и фармакогенетических и геномных показателей. Несмотря на общность происхождения, существуют генетические отличия между разными этническими группами

людей, сформировавшиеся в результате длительной эволюции при взаимодействии генотипа с условиями окружающей среды и являющиеся результатом адаптации организма к образу жизни, рациону питания, климатическим особенностям территории и другим факторам внешней среды. Это предопределено исключительным полиморфизмом генов в человеческих популя-

циях по всему многообразию ферментативных и метаболических систем, что создаёт существенные проблемы в возможностях применения одних и тех же препаратов и стратегий для лечения разных групп населения. В США и других странах мира начато создание этнических лекарств, а в большинстве государств принимаются законодательные ограничения изготовления и реализации препаратов по их побочному действию на основные этнические группы населения [6]. Отличия в воздействии лекарственных препаратов свидетельствуют о наличии внутренних механизмов, определяющих этот феномен. Накопление научных данных о предрасположенности разных этнических групп к развитию определённых заболеваний и стремительное развитие этнической фармакологии показывают необходимость введения новых норм по разработке и тестированию лекарственных препаратов, учитывающих генетические особенности потребителей, что, в свою очередь, предполагает целенаправленное создание биомоделей [1–9, 13, 19] для фармакологической оценки этих препаратов. Огромным прорывом в биомоделировании стала возможность создания гуманизированных мышей, в геном которых искусственно встроен один или несколько генов человека. Использование в исследованиях подобных мышей позволяет получить наиболее полные результаты, т.к. данная модель максимально точно воспроизводит генетические особенности и позволяет более достоверно экстраполировать полученные результаты на человека. В России этим вопросам пока уделяется минимальное внимание, хотя русские являются самым многочисленным народом не только нашей страны, но и всей Европы, с крупными диаспорами в ближнем и дальнем зарубежье. Русские достаточно однородны в антропологическом отношении, с крайне редко встречаемым эпикантусом, близким по аутосомным маркерам с европейскими

народами, особенно северными. По результатам исследования маркёров митохондриальной ДНК они имеют значительные, если не кардинальные, отличия от соседних, тюркских, монголоидных, северо-кавказских и финно-угорских, популяций [22, 24]. Создание трансгенных гуманизированных животных-моделей, несущих ген русского человека, является важнейшим этапом для выяснения особенностей генетических и эпигенетических механизмов патологических процессов и эффектов лекарств.

Сильнейшие вспышки инфекционных заболеваний преследовали человечество на протяжении всей истории. Примерно каждые 100 лет масштабная эпидемия инфекционных заболеваний (чума, «испанка» и пр.) уносила жизни миллионов людей. Не стал исключением и XXI век. Пандемия COVID-19, вируса, преодолевшего кросс-видовой барьер и молниеносно охватившего весь земной шар [10, 23], нанесла серьёзный урон мировой экономике, здравоохранению и социально-экономическим устоям общества. Различия в степени тяжести, симптомах и их выраженности [16], а также накопление данных об этнических особенностях протекания болезни у разных групп населения (появление «британского штамма» и пр.) позволяют предположить наличие внутренних механизмов, оказывающих влияние как на чувствительность организма к вирусу, так и на эффективность применения той или иной терапии.

В конце декабря 2020 г. главный врач Англии Крис Уитти заявил об обнаружении новой разновидности коронавируса SARS-CoV-2, мутация которого привела к большей вирулентности, скорости распространения с чертами популяционного полиморфизма. Клинические наблюдения за течением процессов при поражении коронавирусом презентировали (по данным отчетов московских госпиталей и собственным наблюдениям) документально подтвержденные этнические и популяционные различия у от-

дельных пациентов, что определяло выбор терапевтической и, в целом, врачебной тактики в отношении как русских, так и представителей других этнических групп.

Опыт показывает, что не все препараты, разрешенные к медицинскому применению и хорошо себя зарекомендовавшие в странах Американского континента, Юго-Восточной Азии и Ближнего Востока, были столь же оптимальны в отношении русской популяции. Это особенно относится к медицинским иммуно-биологическим средствам, белковым, пептидным, антибиотическим средствам и противовирусным препаратам.

Группа учёных из США обобщила данные Института биомедицинских исследований и Массачусетского технологического института (США) и отметила позитивность ПЦР-тестов у переболевших COVID-19 даже после выздоровления, о чём сообщили в журнале «Science» [12, 26]. Фрагменты SARS-CoV-2 в принципе способны интегрироваться в геном человека, и это иллюстрируется механизмом обратной транскрипции. Тому подтверждение, что человеческий геном содержит около 98-ми тыс. эндогенных ретровирусных элементов последовательностей ДНК архивирусов, внедрившихся туда более 150-ти тыс. лет назад. Дэвид Балтимор, профессор Массачусетского технологического института, Нобелевский лауреат по физиологии и медицине, «отец геной инженерии», в комментариях к статье отметил, что подтверждена лишь сама возможность интеграции, соответственно, возникают вопросы: остается ли инфицированный SARS-CoV-2 геном человека таковым навсегда? Как тогда это скажется на стратегии лечения? Каковы пути поиска таргетных препаратов? Возможны ли реальные биомодели на основе гуманизированных трансгенных животных, несущих ген человека? Эти и другие вопросы важны для всего научного сообщества. На данном этапе перед мировым сообществом стоит задача разработки оптимальных и адекват-

ных стратегий лечения и профилактики, которые в свою очередь требуют создания надёжных биомоделей.

В НЦБМТ ФМБА России ведётся разработка новой биомодели, а также поддерживаются уже созданные различные модели социально значимых заболеваний. В настоящее время нами описана токсическая модель острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС), которая воспроизводит повреждение организма, аналогичные вирусной пневмонии при COVID-19 [3, 9].

Данная работа посвящена лишь небольшому, но важному фрагменту процесса создания новой биомодели: разработке генно-инженерной конструкции (ГИК) для получения гуманизированных мышей, несущих ген HLA-A*02:01:01:01. Выбор мишени для трансгеноза обусловлен динамикой распределения аллелей генов иммунного ответа среди населения нашей страны. Анализ литературных данных показал, что аллелью, имеющей наибольшую частоту встречаемости у русских людей, является HLA-A*02:01:01:01. На основе этой ГИК в дальнейшем будет создана линия гуманизированных трансгенных мышей, которая может быть использована для решения широкого круга задач, включая исследования инфекционных заболеваний, разработку и тестирование вакцин, тестирование безопасности и иммуногенности, а также для исследований, направленных на изучение онкологических и аутоиммунных заболеваний.

Материалы и методы

Получение первичного биоматериала

Первичный материал (плазма крови) был любезно предоставлен лабораторией трансплантационной иммунологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» (зав. лаб. Ефимов Григорий Александрович). В процессе отбора доноров плазмы учитывались как фенотипические характеристики (отсутствие экипикантуса и пр.), так и генотипические маркёры, а также генеалогия человека.

Таблица 1. Олигонуклеотиды, использованные в работе

Table 1. Oligonucleotides used in research

Праймер	5'-3'-последовательность	Введенный сайт
b2mF	GTTCTAGAGCCACCATGTCTCGCTCCGTGGCCTTAG	XbaI
b2mR	ACCTCATGCTGTGAGAGCATCCACCACCAGAGCCTCCA	
07F	TGGAGGCTCTGGTGGTGGATGCTCTCACAGCATGAGGT	
07R	CACATGAGCCTTTGGGGAATCGGCTCTCTGCAGTGTCTC	
H2F	GAGACACTGCAGAGAGCCGATCCCCAAAGGCTCATGTG	
H2R	ACCAAGCTTCACGCTAGAGAATGAGGGT	HindIII
cbhF	TTGACTAGTCCGTTACATAACTTACGGTAAATGG	SpeI
cbhR	GCTCTAGAACCTGAAAAAAGTGATTTCAGGCAGGTG	XbaI

Бактериальные штаммы и клеточные линии

В работе использовали:

- штамм *E. coli* TOP10 («Invitrogen», США), генотип F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 nupG recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL (Str^R) endA1 λ -;
- клеточные линии HEK-293FT («Thermo Fisher Scientific», США), C2C12 («ATCC», США).

Плазмидные векторы

В разработке ГИК применяли плазмидные векторы pcDNA3.4 («ThermoFisher Scientific», США). pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 (Addgene #42230). Список и последовательности праймеров, использованных в работе, приведены в табл. 1.

Результаты и их обсуждение

Дизайн химерных ДНК-конструкций, включающих нуклеотидные последовательности β_2 -микроглобулина человека, $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -доменов МНС человека (HLA) и $\alpha 3$ -домена МНС мыши для интеграции в геном мыши с целью получения новой гуманизированной трансгенной линии

Для получения структурной части химерного гена было амплифицировано три ДНК-фрагмента: фрагмент гена β_2 -микроглобулина человека с использованием пары праймеров b2mF/b2mR-02

и кДНК библиотеки в качестве матрицы, полученной из клеток линии HEK293 с использованием гексамерных праймеров; фрагмент структурной части гена HLA A, соответствующий доменам $\alpha 1$ и $\alpha 2$, с использованием пары праймеров 02F/02R и синтетической конструкции гена HLA-A*02:01:01:01 («Евроген», Россия); фрагмент гена МНС, соответствующий домену $\alpha 3$ мышинного комплекса гистосовместимости, с использованием пары праймеров H2F-02/H2R и кДНК библиотеки, полученной из клеток линии C2 C12, с использованием гексамерных праймеров.

Для сборки фрагмента из трех частей 5 нг каждого из выделенных фрагментов с первого этапа смешивали, добавляли ПЦР-смесь для полимеразы Phusion High-Fidelity DNA Polymerase («Thermo-Fisher Scientific», США) за исключением праймеров.

Программа амплификации

Программа амплификации была следующей: первичная денатурация 2 мин при 95°C, 10 циклов в режиме: 98°C — 10 с, 60°C — 10 с, 72°C — 60 с. Далее были добавлены праймеры b2mF/H2R, после чего было проведено еще 20 циклов в режиме: 98°C — 10 с, 60°C — 10 с, 72°C — 60 с. В результате был получен ПЦР-фрагмент, соответствующий структурной части гена β -микроглобулина человека, соединенной через глицин-сериновый линкер с $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -доменами

HLA A*02:01:01:01 и $\alpha 3$ -доменом мышиного комплекса H-2K. Полученный ДНК-фрагмент клонировали в плазмиду pCDNA3.4 после предварительной обработки эндонуклеазами рестрикции XbaI и HindIII. Далее был амплифицирован ДНК-фрагмент с использованием пары праймеров cbhF/cbhR и плазмиды pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 в качестве матрицы. ДНК-фрагмент и плазмиды, полученная на предыдущем этапе, были обработаны эндонуклеазами рестрикции SpeI и XbaI. После лигирования был получен вектор, содержащий промотор β -актина цыплат CBH и кодирующий химерный комплекс гистосовместимости первого класса, содержащий кодирующую часть гена β -микроглобулина человека, соединенную через глицин-сериновый линкер с $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -доменами HLA A*02:01:01:01 и $\alpha 3$ -доменом мышиного комплекса H-2K. Полученную плазмиду назвали pCBH-b2m-A0201-h2k (рис. 1).

С целью получения линейного фрагмента ДНК (генной конструкции), предназначенной для микроинъекций, плазмиду pCBH-b2m-A0201-h2k расщепляли эндонуклеазами рестрикции BglII и SalI (имеют более одного сайта рестрикции в исходной плазмиде-векторе). Продукты реакции разделяли с помощью электрофореза в агарозном геле. Полосу, соответствующую по подвижности ДНК-фрагменту размером 3181 п.н., вырезали и выделяли из геля с помощью набора GeneJET Gel Extraction Kit («Thermo-Fisher Scientific», США). Концентрацию ДНК в конечном растворе определяли с помощью флуориметра Qubit («Thermo-Fisher Scientific», США). Схема полученной генной конструкции приведена на рис. 2, размеры и описание ее фрагментов — в табл. 2.

Для изучения реакций молекул HLA класса I (HLA CI) с цитотоксическими Т-лимфоцитами (Т-киллеры, CTL) во многих лабораториях мира были созданы

животные-модели — гуманизированные трансгенные мыши, экспрессирующие немодифицированные молекулы HLA CI [11]. Однако при заражении этих мышей вирусами, презентруемыми молекулами других аллелей HLA CI, преимущественно развивались CD8 CTL-ответы на H-2-рестрикты [14]. Замена HLA $\alpha 3$ -домена гомологичным доменом H-2 значительно улучшает распознавание и использование молекул HLA CI: в таких условиях мобилизуется разнообразный Т-клеточный репертуар V β - и V α -рецепторов у мышей, что позволяет более эффективно использовать молекулы HLA CI [18].

Наиболее удачным для получения HLA-гуманизированных мышей оказалось создание моноцепочечной химерной конструкции, содержащей последовательности β_2 -микроглобулина человека, $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -доменов HLA и H-2 мыши, кодирующей $\alpha 3$ -домен, трансмембранную и цитоплазматическую части: $\beta 2m$ -HLA-H-2 (HND). Такие мыши, созданные на основе животных с двойным нокаутом (H-2Db/- $\beta 2m$ /-), почти лишены молекул H-2 класса I (рис. 3). Фенотипический и функциональный анализ их периферического репертуара CD8 Т-клеток показал, что химерный белок, продукт HND для аллеля HLA-A2.1, поддерживают тимусную положительную селекцию CD8 CTL и активируют CTL HLA-A2.1 вирус-специфических рестрикторов на периферии [20]. Общий размер линейной генной конструкции HND составлял 4 тыс. п. н. Ее человеческая часть содержала в себе промотор и первый экзон (кодирующий лидерную последовательность) HLA-A2.1, кДНК β_2 -микроглобулина человека и линкерную последовательность, 2-й экзон ($\alpha 1$) и интрон, 3-й экзон ($\alpha 2$ -домен) и часть 3-го интрона HLA-A2.1. Мышиная часть содержала часть 3-го интрона, 4-й экзон ($\alpha 3$ -домен) и 5–8-й экзоны с интронами и 3'нетранслируемым регионом H-2D. Следует отметить,

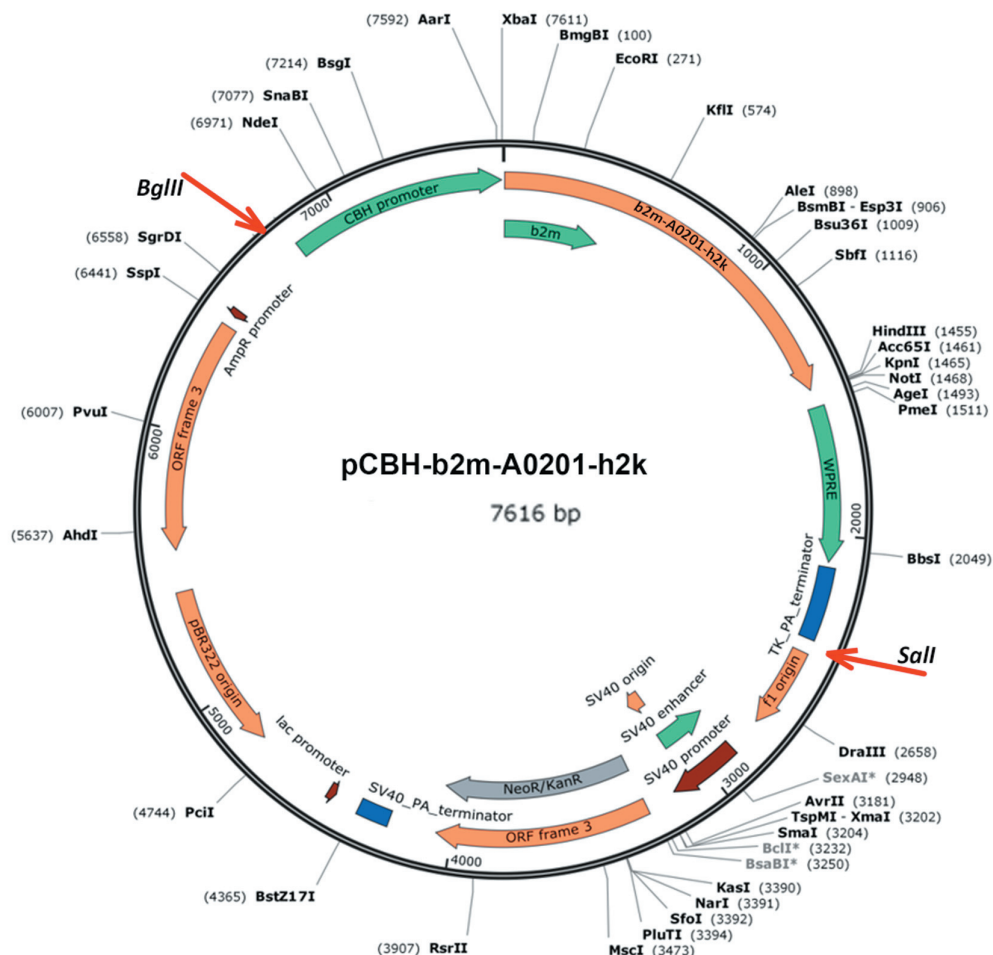


Рис. 1. Схема плазмиды pCBH-b2m-A0201-h2k, полученной на основе плазмиды-вектора pcDNA3.4.

Примечание: ДНК-последовательность CMV-промотора плазмиды pcDNA3.4 была заменена последовательностью CBH-промотора, амплифицированного с плазмиды pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9. Красными стрелками указаны сайты рестрикции для вырезания линейного фрагмента CBH-b2m_A0201-h2k.

Fig. 1. Map of pCBH-b2m-A0201-h2k plasmid derived from plasmid vector pcDNA3.4.

Note: CMV promoter in plasmid pcDNA3.4 is replaced with promoter CBH from plasmid pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9. Red arrows denote restriction sites flanking linear fragment CBH-b2m_A0201-h2k.

что в трансфицированной клеточной культуре RMA-лимфомы мыши уровень экспрессии химерного белка был выше, если в генной конструкции использовали $\beta 2m$ человека, а не мыши [20]. Этот эффект объясняется более эффективной ассоциацией цепи HLA с $\beta 2m$ человека, чем с мышиным, что позволяет более быстро переносить молекулы HLA из эндоплазматическо-

го ретикулула в аппарат Гольджи в клетках мышей, ко-трансфицированных ДНК HLA C1 и $\beta 2m$ человека или мыши [21].

$\beta 2m$ -микроглобулин в комплексе с антигенами МНС C1 находится на мембранах всех ядросодержащих клеток организма, присутствует во всех его биологических жидкостях. В большом количестве белок представлен на лимфоцитах. Присутствие

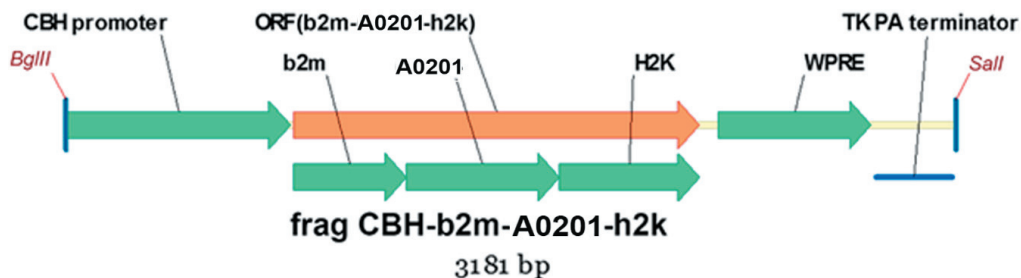


Рис. 2. Схема линейного фрагмента frag CBH-b2m_A0201-h2k ДНК, предназначенной для микроинъекций.

Примечание: линейный фрагмент содержит CBH-промотор, структурную часть гена b2m человека, соединенные глицин-сериновым линкером с $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -доменами молекулы HLA- A*02:01:01:01 и $\alpha 3$ -доменом молекулы H-2K, посттрансляционный регуляторный элемент WPRE и сигнал полиаденилирования TK PA.

Fig. 2. Map of linear fragment CBH-b2m_A0201-h2k used in microinjection.

Note: linear fragment contains CBH promoter, human b2m coding region tied by glycine-serine linker with HLA-A*02:01:01:01 α_1 and α_2 domains and H-2K α_3 domain, posttranslational regulatory element WPRE and Poly (A) signal TK PA.

Таблица 2. Структура генной конструкции frag_CBH-b2m-A-0201-h2k (3181 п. н.)

Table 2. Structure of frag_CBH-b2m-A-0201-h2k construct (3181 bp)

Фрагмент	Размер, п. н.	Описание
CBH-b2m-A0201-h2k	3181	генная конструкция
CBH	796	промотор
β_2 m человека	402	β_2 -микроглобулин человека
Экзон 1	67	
Экзон 2	279	
Экзон 3 (до TAA)	11	
Линкер (Гли4 Сер1) x3	45	линкер
Фрагмент HLA — A0201	540	фрагмент МНС I класса человека (домены $\alpha 1$, $\alpha 2$)
Фрагмент h2k	501	фрагмент МНС I класса мыши
mEx4	276	домен $\alpha 3$ H-2K
mEx5	120	цитозольный фрагмент белка
mEx6	33	
mEx7	39	
mEx8	32	
WPRE	676	посттрансляционный регуляторный элемент
TK-PA-terminator	271	сигнал полиаденилирования

$\beta 2$ m в сыворотке крови обусловлено процессами деградации и репарации клеток. Он необходим для экспрессии на клеточной поверхности белков МНС класса I и стабильности канавки связывания пептидов. В отсутствие $\beta 2$ -микроглобулина на поверхности клеток могут быть обнаружены очень ограниченные количества молекул МНС CI. В их отсутствие CD8-T-клетки, участвующие в форми-

ровании приобретенного иммунитета, не развиваются.

Полученная линия ННД-мышей в дальнейшем успешно использовалась в различных целях. Например, гибридную конструкцию ННД использовали для оценки возможности молекул HLA-A2.1 опосредовать участие автореактивного ответа CD8+ T-клеток в развитии диабета типа 1 (T1D): носители ряда генов МНС CI, вклю-

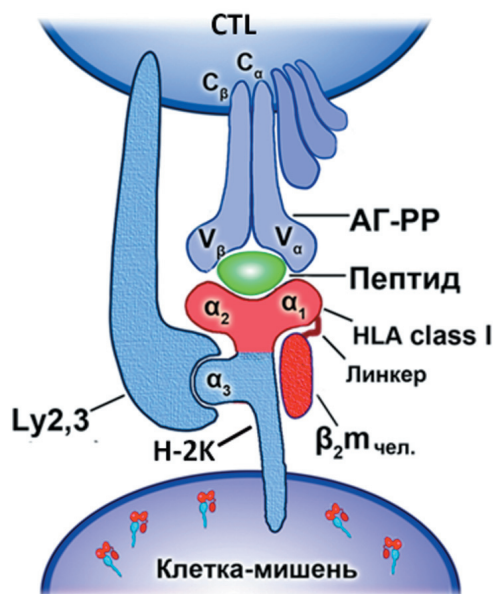


Рис. 3. Взаимодействие HLA CI (продукт гибридного типа) с распознающими рецепторами цитотоксического Т-лимфоцита (CTL). При трансгенозе $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -домены мышинного гена замещены соответствующими фрагментами гена HLA человека, $\alpha 3$ — замещен соответствующими фрагментами гена H-2K мыши, $\beta 2m$ замещен соответствующим фрагментом микроглобулина человека, соединенным через линкер с HLA человека.

Примечание: АГ-РР — антиген, распознающий рецептор; $\beta 2m$ — $\beta 2$ -микроглобулин; клетка-мишень — антиген-презентирующая клетка; Ly2,3 — мышинный эквивалент рецептора CD8 человека.

Fig. 3. Interaction of HLA CI (chimeric) with cytotoxic T lymphocyte (CTL) specific receptors. In transgenesis, murine $\alpha 1$ and $\alpha 2$ domains are substituted by corresponding fragments of human HLA gene, $\alpha 3$ — by corresponding fragments of murine H-2K and $\beta 2m$ — by corresponding human microglobulin sequence linker-tied with human HLA.

Note: АГ-РР — receptor-specific antigen; $\beta 2m$ — $\beta 2$ -microglobulin; клетка-мишень — antigen-presenting cell; Ly2,3, — murine homologue of human CD8 receptor.

чая HLA-A*0201 (HLA-A2.1), в сочетании с некоторыми молекулами MHC C2, имеют склонность к его развитию. T1D ускоряется у NOD-трансгенных мышей, экспрессирующих тяжелую цепь HLA-A2.1. Линия NOD. $m\beta 2mnull$ h $\beta 2m$.HLA-A2.1hyb оказалась востребована для изучения T1D [25]. Введение точечной мутации в одноцепо-

точный тример HLA класса I индуцирует усиление прайминга CTL и противоопухолевого иммунитета.

Результатом использования созданной генной конструкции должны стать трансгенные мыши, экспрессирующие такой же химерный белок MHC CI $\beta 2m$ -HLA-H-2 на поверхности клеток. Однако генные конструкции, созданные нами, имеют принципиальные отличия от зарубежных разработок [25]. Во-первых, мы использовали СВН-промотор, который обеспечивает устойчивую долгосрочную экспрессию во всех клетках, наблюдаемых при использовании традиционных сильных промоторов, — CMV (цитомегаловирусный) или CBA (β -актина цыпленка), включая проводящие нейроны [15]. Кроме того, была использована сигнальная последовательность полиаденилирования тимидинкиназы HSV. Во-вторых, в состав ГИК нами был внесен WPRE фрагмент (посттрансляционный регуляторный элемент вируса гепатита сурка) — последовательность ДНК, которая при транскрибировании создает третичную структуру, усиливающую экспрессию гена [17]. «Белковая» часть, в отличие от прототипа, построена только из кДНК фрагментов MHC CI человека и мыши. При этом мы не включали в состав конструкции первый экзон, кодирующий последовательность лидерного пептида HLA, оставив последовательность сигнального пептида $\beta 2$ -микроглобулина человека.

И созданная нами, и HND генные конструкции предназначены для классического трансгеноза, т.е. все полученные трансгенные мыши будут отличаться как по сайту интеграции трансгена, по количеству его копий, так и по эффективности экспрессии химерного MHC CI. Есть основания предполагать, что структурные элементы, внесенные нами в генетическую конструкцию, позволят получить мышь с устойчивой высокой экспрессией хи-

мерного HLA-A*02:01. А использование технологии CRISPR/Cas9 для нокаута гена $\beta 2m$ мыши приведет к полной элиминации молекул H-2 у гуманизированной по HLA CI линии мышей.

Заключение

Развитие технологий гомологической рекомбинации, дизайна химерных ДНК-конструкций и новых подходов к редактированию генома, включая CRISPR/Cas9 и его модификаций, сделало возможным получение гуманизированных животных с точечными генетическими модификациями для решения конкретных биомедицинских проблем. Наряду с бурными успехами зарубежных генетиков и биотехнологов в этом направлении, в России крупнейшими центрами, где проводятся подобные исследования, являются НЦБМТ ФМБА России, Институт биологии гена РАН и Федеральный исследовательский центр Сибирского отделения РАН. Тем не менее число потребителей трансгенных и нокаутных мышей и крыс, закупаемых за рубежом для лабораторий нашей страны, неукоснительно растет. Их использование сдерживается продолжительностью транспортировки и карантинных процедур, зачастую невозможностью их последующего воспроизводства и предельно высокой стоимостью от 350 до 3750 долларов США за особь. Так, основным производителем и коммерческим поставщиком трансгенных и нокаутных мышей является американская фирма «Taconic», которая имеет несколько производственных площадок как на территории США, так и в Европе. Однако, несмотря на лидерство в производстве трансгенных мышей, применение биомodelей «Taconic» существенно ограничено по ряду причин, основными из которых являются:

а) цена и неопределённые сроки поставки (карантин и пр.);

б) в большинстве случаев отсутствует возможность заказа на мышей по возрасту

и весу, т.е. полученная когорта мышей будет неоднородной, что может исказить результаты исследований;

в) отличия в гаплотипе мышей.

Проведённые нами исследования показали несоответствие заявленного в литературе гаплотипа базовых мышей действительности: наша линия CBA/C57Bl/6Y имеет гаплотип H2-K^k. Развитие отечественных лабораторий по производству трансгенных и нокаутных мышей открывает широкие возможности для создания биомodelей, отвечающих задачам конкретного исследования, а отсутствие карантина позволяет получать мышей в существенно более короткий срок и значительно снижает их себестоимость.

На сегодняшний день питомники и виварии предлагают широкий спектр модельных животных. Однако далеко не всегда эти животные удовлетворяют запросам экспериментаторов, которым либо приходится подстраиваться под имеющиеся линии, либо тратить деньги, время на поиск и доставку более подходящих моделей. Основной нашей концепцией является направленный дизайн генетических конструкций на основе химерных ДНК генов человека и мыши для последующей интеграции в геном мыши с целью получения новой гуманизированной трансгенной линии, т.е. мы переходим от случайного выбора или поиска животных к созданию адекватных и оптимальных линий под конкретные эксперименты.

Одним из наиболее востребованных и активно развивающихся направлений исследований являются изыскания в области иммунологии. С каждым годом количество известных болезней увеличивается, что влечёт за собой необходимость дизайна и апробации новых лекарственных препаратов и вакцин, разработку эффективных схем терапии. Создание адекватных моделей, отвечающих задачам конкретного исследования, является ключевым

этапом на пути создания нового препарата или вакцины.

В этой статье рассмотрен процесс создания генно-инженерной конструкции, кодирующей гибридную молекулу МНС I класса, состоящую из β_2 -микроглобулина человека, $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -доменов HLA человека и $\alpha 3$ -домена мышиного комплекса H-2K. В данной работе впервые представлен дизайн молекулы, в составе которой находится человеческий β_2 -микроглобулин. Полученный вектор включает в себя β_2 -микроглобулин человека, $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -домены HLA человека и $\alpha 3$ -домен мышиного комплекса H-2K (рис. 3). Для получения линейных фрагментов, пригодных для микроинъекций в пронуклеусы зигот, вектор был подвергнут рестрикции эндонуклеазами с последующим разделением полученных фрагментов методом гель-электрофореза. Выделенный из геля готовый линейный фрагмент будет в дальнейшем использован для получения линии гуманизированных трансгенных мышей.

НЦБМТ ФМБА России систематически занимается созданием моделей для оценки социально-значимых болезней человека [1, 7, 9]. Особую значимость данная работа приобретает в связи с пандемией COVID-19, когда необходимость в адекватных и современных биомоделях для фармакологической оценки новых лекарств очень велика. Получаемая модель несёт специфический вариант HLA, что позволит подробно изучить молекулярно-генетические механизмы воздействия лекарственных препаратов на русского человека. Использование модели предполагается для решения широкого круга задач, включая исследования

инфекционных заболеваний, разработку и тестирование вакцин, тестирование безопасности и иммуногенности, а также для исследований, направленных на изучение онкологических и аутоиммунных заболеваний. Модель позволяет идентифицировать эпитопы, ограниченные супертипом HLA-A*02:01:01:01.

Возможность редактирования генома открывает перед нами огромные возможности по созданию и изучению модельных животных, отвечающих задачам исследования. Использование гуманизированных трансгенных мышей позволяет моделировать с высокой степенью достоверности различные заболевания и иммунодефицитные состояния человека, что является очень ценным при апробации новых подходов в лечении тех или иных заболеваний и экстраполяции результатов исследований на человека. Созданная генно-инженерная конструкция является первым шагом на пути создания первой в своём роде линии гуманизированных трансгенных мышей, отражающей специфические особенности генотипа, характерные для русского населения. Авторы дают себе отчёт, что определение русского человека достаточно условно и выбранная аллель присутствует во многих популяциях. Однако собственные изыскания в области HLA-типирования позволяют утверждать, что аллель HLA*A02:01:01:01 в наибольшей степени соответствует русскому человеку, что определяет актуальность и целесообразность создания линии трансгенных гуманизированных мышей, несущих данную аллель гена человека.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Дуля М.С., Каркищенко В.Н., Хвостов Д.В., Агельдинов Р.А., Каркищенко Н.Н. Цитокиновый профиль лабораторных инбредных и трансгенных мышей в оценке иммунологического статуса и поиске новых фармакологических регуляторов. *Биомедицина*. 2019;15(2):54–62. [Dulya M.S., Karkischenko V.N., Khvostov D.V., Ageldinov R.A., Karkischenko N.N. Tsitokinovyy profil' laboratornykh inbrednykh i transgennykh myshey v otsenke immunologicheskogo statusa i poiske novykh farmakologicheskikh regulyatorov [Cytokine Profile of Laboratory Inbred and Transgenic Mice in the

- Evaluation of the Immunological Status and Search for New Pharmacological Regulators]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2019;15(2):54–62. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-15-2-54-62.
2. Каркищенко В.Н., Болотских Л.А., Капанадзе Г.Д., Каркищенко Н.Н., Колоскова Е.М., Максименко С.В., Матвеев Е.Л., Петрова Н.В., Рябых В.П., Ревякин А.О., Станкова Н.В., Семенов Х.Х. Создание линий трансгенных животных-моделей с генами человека NAT1 и NAT2. *Биомедицина*. 2016;1:74–84. [Karkischenko V.N., Bolotskikh L.A., Kapanadze G.D., Karkischenko N.N., Koloskova E.M., Maksimenko S.V., Matveyenko E.L., Petrova N.V., Ryabykh V.P., Revyakin A.O., Stankova N.V., Semenov Kh.Kh. Sozdaniye liniy transgennykh zhivotnykh-modeley s genami cheloveka NAT1 i NAT2 [Creation of lines of transgenic animal models with human genes NAT1 and NAT2]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2016;1:74–84. (In Russian)].
 3. Каркищенко В.Н., Помыткин И.А., Скворцова В.И. Опиоидэргическая система иммунных клеток: новая фармакологическая мишень в терапии «цитокинового шторма». *Биомедицина*. 2020;16(4):14–23. [Karkischenko V.N., Pomytkin I.A., Skvortsova V.I. Opioidergicheskaya sistema immunnykh kletok: novaya farmakologicheskaya mishen' v terapii «tsitokinovogo shtorma» [The Opioidergic System of Immune Cells: A New Pharmacological Target in the Therapy of “Cytokine Storm”]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2020;16(4):14–23. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-16-4-14-23.
 4. Каркищенко В.Н., Рябых В.П., Болотских Л.А., Семенов Х.Х., Капанадзе Г.Д., Петрова Н.В., Езерский В.А., Жукова О.Б., Колоскова Е.М., Максименко С.В., Столярова В.Н., Трубицына Т.П. Физиолого-эмбриологические аспекты создания трансгенных мышей с интегрированными генами NAT1 и NAT2 человека. *Биомедицина*. 2016;1:52–65. [Karkischenko V.N., Ryabykh V.P., Bolotskikh L.A., Semenov Kh.Kh., Kapanadze G.D., Petrova N.V., Ezerskiy V.A., Zhukova O.B., Koloskova E.M., Maksimenko S.V., Stolyarova V.N., Trubitsyna T.P. Fiziologo-embriologicheskiye aspekty sozdaniya transgennykh myshey s integririrovannymi genami NAT1 i NAT2 cheloveka [Physiological and embryological aspects of creating transgenic mice with integrated human NAT1 and NAT2 genes]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2016;1:52–65. (In Russian)].
 5. Каркищенко В.Н., Рябых В.П., Каркищенко Н.Н., Дуля М.С., Езерский В.А., Колоскова Е.М., Лазарев В.Н., Максименко С.В., Петрова Н.В., Столярова В.Н., Трубицына Т.П. Молекулярно-генетические аспекты технологии получения трансгенных мышей с интегрированными генами N-ацетилтрансферазы (NAT1 и NAT2) человека. *Биомедицина*. 2016;1:4–17. [Karkischenko V.N., Ryabykh V.P., Karkischenko N.N., Dulya M.S., Ezerskiy V.A., Koloskova E.M., Lazarev V.N., Maksimenko S.V., Petrova N.V., Stolyarova V.N., Trubitsyna T.P. Molekulyarno-geneticheskiye aspekty tekhnologii polucheniya transgennykh myshey s integririrovannymi genami NAT1 i NAT2 cheloveka [Molecular and genetic aspects of the technology for producing transgenic mice with integrated genes of human N-acetyltransferase (NAT1 and NAT2)]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2016;1:4–17. (In Russian)].
 6. Каркищенко Н.Н. *Альтернативы биомедицины. Т. 2. Классика и альтернативы фармакотоксикологии*. М.: Изд-во ВПМК, 2007:448. [Karkischenko N.N. *Alternativy biomeditsiny. T. 2. Klassika i alternativy farmakotoksikologii* [Biomedicine alternatives. Vol. 2. Classics and alternatives of pharmacotoxicology]. Moscow: Izdatel'stvo VPK, 2007:448. (In Russian)].
 7. Каркищенко Н.Н., Петрова Н.В., Слободенюк В.В. Высокоспецифичные видовые праймеры к генам Nat1 и Nat2 для сравнительных исследований у человека и лабораторных животных. *Биомедицина*. 2014;1(2):4–24. [Karkischenko N.N., Petrova N.V., Slobodenyuk V.V. Vysokospetsifichnyye vidovyye prajmery k genam Nat1 i Nat2 dlya sravnitel'nykh issledovaniy u cheloveka i laboratornykh zhivotnykh [Highly specific species primers for the Nat1 and Nat2 genes for comparative studies in humans and laboratory animals]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2014;1(2):4–24. (In Russian)].
 8. Каркищенко Н.Н., Рябых В.П., Каркищенко В.Н., Колоскова Е.М. Создание гуманизированных мышей для фармакотоксикологических исследований (успехи, неудачи и перспективы). *Биомедицина*. 2014;1(3):4–22. [Karkischenko N.N., Ryabykh V.P., Karkischenko V.N., Koloskova E.M. Sozdanie humanizirovannykh myshey dlya farmakotoksikologicheskikh issledovaniy (uspekhi, neudachi i perspektivy) [Creation of humanized mice for pharmacotoxicological research (successes, failures and prospects)]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2014;1(3):4–22. (In Russian)].
 9. Помыткин И.А., Каркищенко В.Н., Фокин Ю.В., Нестеров М.С., Петрова Н.В. Модель фатального острого поражения легких и острого респираторного дистресс-синдрома. *Биомедицина*. 2020;16(4):24–33. [Pomytkin I.A., Karkischenko V.N., Fokin Yu.V., Nesterov M.S., Petrova N.V. Model' fatal'nogo ostrogo porazheniya legkikh i ostrogo respiratornogo distress-sindroma [A Model of Fatal Acute Lung Injury and Acute Respiratory Distress Syndrome]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2020;16(4):24–33. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-16-4-24-33.
 10. Ali M.K., Shah D.J., del Rio C. Preparing Primary Care for COVID-20. *J. Gen Intern. Med*. 2020. DOI: 10.1007/s11606-020-05945-5.
 11. Arnold B., Hämmerling G.J. MHC class-I transgenic mice. *Annu. Rev. Immunol*. 1991;9:297–322. DOI: 10.1146/annurev.iy.09.040191.001501.

12. Cohen J. The coronavirus may sometimes slip its genetic material into human chromosomes — but what does that mean? *Science*. 2020. DOI:10.1126/science.abg2000.
13. de Abreu M.S., Giacomini A.C.V., Genario R., Dos Santos B.E., da Rosa L.G., Demin K.A., et al. Neuropharmacology, pharmacogenetics and pharmacogenomics of aggression: The zebrafish model. *Pharmacol. Res.* 2019;141:602–608. DOI: 10.1016/j.phrs.2019.01.044.
14. Engelhard V.H., Lacy E., Ridge J.P. Influenza A-specific, HLA-A2.1 restricted cytotoxic T lymphocytes from HLA-A2.1 transgenic mice recognize fragments of the M1 protein. *J. Immunol.* 1991;146:1226–1232.
15. Gray S.J., Foti S.B., Schwartz J.W., Bachaboina L., Taylor-Blake B., Coleman J., et al. Optimizing promoters for recombinant adeno-associated virus-mediated gene expression in the peripheral and central nervous system using self-complementary vectors. *Hum. Gene Ther.* 2011;22(9):1143–1153. DOI: 10.1089/hum.2010.245.
16. Kuri-Cervantes L., Pampena M.B., Meng W., Rosenfeld A.M., Ittner C.A.G., Weisman A.R., et al. Comprehensive mapping of immune perturbations associated with severe COVID-19. *Sci. Immunol.* 2020;5(49):eabd7114. DOI: 10.1126/sciimmunol.abd7114.
17. Lee Y.B., Glover C.P., Cosgrave A.S., Bienemann A., Uney J.B. Optimizing regulatable gene expression using adenoviral vectors. *Exp. Physiol.* 2005;90(1):33–37. DOI: 10.1113/expphysiol.2004.028209.
18. Man S., Ridge J.P., Engelhard V.H. Diversity and dominance among TCR recognizing HLA-A2.1+ influenza matrix peptide in human MHC class I transgenic mice. *J. Immunol.* 1994;153(10):4458–4467.
19. Marshall S., Madabushi R., Manolis E., Krudys K., Staab A., Dykstra K., et al. Model-Informed Drug Discovery and Development: Current Industry Good Practice and Regulatory Expectations and Future Perspectives. *CPT Pharmacometrics Syst. Pharmacol.* 2019;8(2):87–96. DOI: 10.1002/psp4.12372.
20. Pascolo S., Bervas N., Ure J.M., Smith A.G., Lemonnier F.A., Péramau B. HLA-A2.1-restricted education and cytolytic activity of CD8(+) T lymphocytes from beta2 microglobulin (beta2m) HLA-A2.1 monochain transgenic H-2Db beta2m double knock-out mice. *J. Exp. Med.* 1997;185(12):2043–2051. DOI: 10.1084/jem.185.12.2043.
21. Péramau B., Gillet A., Hakem R., Barad M., Lemonnier F.A. Human β_2 -microglobulin specifically enhances cell surface expression of HLA class I molecules in transfected murine cells. *J. Immunol.* 1988;141:1383–1389.
22. Phan V.H., Moore M.M., McLachlan A.J., Piquette-Miller M., Xu H., Clarke S.J. Ethnic differences in drug metabolism and toxicity from chemotherapy. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 2009;5(3):243–257. DOI: 10.1517/17425250902800153.
23. Pooladanda V., Thatikonda S., Godugu C. The current understanding and potential therapeutic options to combat COVID-19. *Life Sci.* 2020;254:117765.
24. Sontoredjo T.A., de Boer A., Maitland-van der Zee A.H. Etnische farmacogenetica [Ethnicity in pharmacogenetics]. *Ned Tijdschr Geneesk.* 2013;157(17):A6118.
25. Takaki T., Marron M.P., Mathews C.E., Guttmann S.T., Bottino R., Trucco M., et al. HLA-A*0201-Restricted T Cells from Humanized NOD Mice Recognize Autoantigens of Potential Clinical Relevance to Type 1 Diabetes. *J. Immunol.* 2006;176:3257–3265.
26. Zhang L., Richards A., Khalil A., Wogram E., Ma H., Young R.A., et al. SARS-CoV-2 RNA reverse-transcribed and integrated into the human genome. *bioRxiv. The preprint server for biology*. 2020. DOI: 10.1101/2020.12.12.422516.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

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

Петрова Наталья Владимировна*, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: m-sklad@yandex.ru

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

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

Nataliya V. Petrova*, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: m-sklad@yandex.ru

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

Огнева Настасья Сергеевна, ФГБУН
«Научный центр биомедицинских технологий
ФМБА России»;

e-mail: ognevanastya@mail.ru

Колоскова Елена Михайловна, к.б.н.,
Всероссийский научно-исследовательский ин-
ститут физиологии, биохимии и питания жи-
вотных — филиал ФГБНУ «Федеральный на-
учный центр животноводства — ВИЖ им. акад.
Л.К. Эрнста»;

e-mail: heleko3@yandex.ru

Максименко Сергей Васильевич, к.б.н.,
ФГБУН «Научный центр биомедицинских тех-
нологий ФМБА России»;

e-mail: vx136@rambler.ru

Манувера Валентин Александрович, к.б.н.,
ФГБУ «Федеральный научно-клинический
центр физико-химической медицины ФМБА
России»;

e-mail: ymanuvera@yandex.ru

Бобровский Павел Александрович, ФГБУ
«Федеральный научно-клинический центр фи-
зико-химической медицины ФМБА России»;

e-mail: pbobrovskiy@gmail.com

Лазарев Василий Николаевич, д.б.н., доц.,
ФГБУ «Федеральный научно-клинический
центр физико-химической медицины ФМБА
России»;

e-mail: lazar0@mail.ru

Nastasya S. Ogneva, Scientific Center of
Biomedical Technologies of the Federal Medical
and Biological Agency of Russia;

e-mail: ognevanastya@mail.ru

Elena M. Koloskova, Cand. Sci. (Biol.), All-
Russian Research Institute of Physiology,
Biochemistry and Animal Nutrition — branch of the
Federal Scientific Centre of Animal Husbandry —
All-Russian Institute of Animal Husbandry named
after acad. L.K. Ernst;

e-mail: heleko3@yandex.ru

Sergey V. Maksimenko, Cand. Sci. (Biol.),
Scientific Center of Biomedical Technologies of the
Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: vx136@rambler.ru

Valentin A. Manuvera, Cand. Sci. (Biol.), Federal
Research and Clinical Center of Physical-Chemical
Medicine of the Federal Medical and Biological
Agency of Russia;

e-mail: ymanuvera@yandex.ru

Pavel A. Bobrovsky, Federal Research and Clinical
Center of Physical-Chemical Medicine of the
Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: pbobrovskiy@gmail.com

Vassili N. Lazarev, Dr. Sci. (Biol.), Assoc. Prof.,
Federal Research and Clinical Center of Physical-
Chemical Medicine of the Federal Medical and
Biological Agency of Russia;

e-mail: lazar0@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

ФИТОТЕРАПЕВТИЧЕСКАЯ И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ ТАКТИКА ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ КАБАРГИ КАК ЖИВОТНЫХ-ПРОДУЦЕНТОВ ВЫСОКОКАЧЕСТВЕННОГО МУСКУСА

М.М. Борисова^{1,*}, М.А. Чечушков², Л.А. Таболякова¹

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

² Ассоциация «Центр поддержания популяции редких видов животных «Алтайэкосфера»»
649002, Российская Федерация, Республика Алтай, Горно-Алтайск, ул. Промышленная, 5/1, офис 7

Кабарга — животное, представляющее исключительную ценность как продуцент высококачественного мускуса, чем обусловлена необходимость отработки надлежащих ветеринарных тактик их вольерного содержания. Основные оцениваемые параметры мониторинга здоровья кабарги: наличие инфекционных и протозойных заболеваний, гельминтозов и расстройств желудочно-кишечного тракта. Разработана система неинвазивного мониторинга здоровья и определены критерии фитотерапевтической и фармакологической профилактики и лечения кабарги в условиях вольеров для дальнейшего изучения их влияния на качество мускуса.

Ключевые слова: кабарга, мускус, ветеринария, профилактика

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Борисова М.М., Чечушков М.А., Таболякова Л.А. Фитотерапевтическая и фармакологическая тактика профилактики и лечения кабарги как животных-продуцентов высококачественного мускуса. *Биомедицина*. 2021;17(1):24–34. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-1-24-34>

Поступила 11.10.2020

Принята после доработки 25.11.2020

Опубликована 10.03.2021

PHYTOTHERAPEUTIC AND DRUG PROPHYLAXIS AND TREATMENT IN MUSK DEER, AN ANIMAL SOURCE OF HIGH-QUALITY MUSK

Mariya M. Borisova^{1,*}, Mikhail A. Chechushkov², Lidiya A. Taboyakova¹

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

² Association «Center for Maintaining the Population of Rare Species of Animals «Altayekosphaera»»
649002, Russian Federation, Republic of Altai, Gorno-Altaysk, Promyshlennaya Street, 5/1, office 7

The musk deer possesses an exceptional value for producing high-quality musk, which warrants the development of appropriate veterinary strategies for its captive breeding. The main profile of musk deer health monitoring is assessed: the presence of infectious and protozoan diseases, helminthiases and gastrointestinal disorders. We present a strategy for non-invasive health monitoring and criteria for phytotherapeutic and drug prophylaxis and treatment in open-cage captivity of musk deer for further research into their impact on musk quality.

Keywords: musk deer, musk, veterinary medicine, prophylaxis

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

For citation: Borisova M.M., Chechushkov M.A., Taboyakova L.A. Phytotherapeutic and Drug Prophylaxis and Treatment in Musk Deer, an Animal Source of High-Quality Musk. *Journal Biomed.* 2021;17(1):24–34. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-1-24-34>

Submitted 11.10.2020

Revised 25.11.2020

Published 10.03.2021

Введение

Кабарга, как животное-продуцент высококачественного мускуса, только относительно недавно начала вводиться в зоокультуру России. Осторожный нрав кабарги и пугливость, наряду с малочисленностью, не позволяют достоверно выявлять заболевания в естественной среде обитания. Если ранее кабарга была исключительно диким животным, и причины гибели в естественной среде отслеживались только в случае нахождения тел погибших животных, то сейчас, в связи с переводом на вольерное содержание, появилась возможность т.н. «диспансеризации» животных, которая регламентируется Ветеринарным законодательством РФ [9]. В условиях вольерных комплексов при работе с каждой особью индивидуально появилась возможность отслеживать развитие тех или иных болезней, проводить профилактику и даже лечение животных.

Было выявлено, что кабарга подвержена таким инфекционным заболеваниям, как сибирская язва, бруцеллёз, сальмонеллёз, некробациллёз, пастереллёз, туберкулёз, ящур.

Кабарга является хозяином более 20-ти видов гельминтов, из них на Алтае выявлено 9 видов нематод (*Capillaria bovis*, *Cysticercus tenuncollis*, *Dictyocaulus viviparus*, *Nematodirella longissimespiculata*, *Nematodirus filicollis*, *Ostertagia ostertagia*, *Pneumocaulus kadenazii*, *Trichostrongylus colubriformis*, *Trichostrongylus axei*) и 2 вида цестод (*Moniezia benedeni*, *Moniezia expansa*). Гельминтозы способствуют истоще-

нию животных. Абсолютное большинство видов гельминтов являются не только общими для домашних и диких копытных, но они могут встречаться и у других животных, а также у человека [7].

Летом кабарга, как и другие копытные, страдает от кровососущих насекомых. Много беспокойства кабарге причиняют несколько видов комаров, мошки, слепни, мокрицы, синантропные мухи, блохи, власоеды, носоглоточные оводы — *Pharyngomyia picta*. Особо досаждают оленьи кровососки (*Lipoptena cervi*). Страдает кабарга от иксодовых клещей, таких как *Ixodes persulcatus* P.

Из незаразных заболеваний для вольерной кабарги характерны такие заболевания, как стоматит и энтерит, возникающие при неправильном кормлении; воспаление печени, причиной которого практически всегда является зараженность гельминтами и следующая за этим интоксикация организма; пневмония; риниты; заболевания ЖКТ; отравления и т.д.

В период содержания в вольерах у кабарги зарегистрированы травмы самок в результате агрессии взрослых самцов. Характер и место повреждений очень разнообразны: раны и ушибы, вывихи, повреждения внутренних органов и др. Чаще наблюдаются ушибы и раны не выше средней тяжести, не требующие ветеринарного вмешательства. Травмы наносятся кабаргой друг другу в период гона и во время иерархических взаимодействий. У молодых низкоранговых особей кабарги в результате агрессии (ударов передними ногами, ударов клыками)

со стороны взрослых и доминирующих особей чаще всего травмируется круп, спина в районе крестца. Также регистрируются случаи гибели животных в результате агрессии взрослых самцов от тяжелых множественных ран с повреждением внутренних органов: прободением брюшной стенки, разрывом легкого, проникающими ранами в области сердца, разрывом почек и печени.

Целью работы стала разработка критериев фитотерапевтической и фармакологической профилактики и лечения кабарги в условиях вольерного содержания.

Исходя из цели, были сформулированы следующие задачи:

1. Анализ заболеваемости кабарги сибирской Алтайского региона обитания в вольерных комплексах.
2. Диагностика заболеваний кабарги и верификация результатов.
3. Обоснование проведения фитотерапевтической и фармакологической профилактики и лечения кабарги.

Материалы и методы

В исследовании принимали участие молодняк и взрослые особи кабарги сибирской (*Moschus moschiferus*) Алтайского региона обитания в количестве, достаточном для полной регистрации изучаемых признаков: 15 самцов и 15 самок в возрасте до 1-го года массой тела 6–8 кг; 25 самцов и 25 самок в возрасте от 4-х до 6-ти лет массой тела 9–11 кг.

Животных содержали в индивидуальных вольерах открытого типа размером 120–800 м² темнохвойной тайги, отгороженной сеткой высотой 2,5 м и размером ячеей 5×5 см. В качестве корма применялись лишайник древесный (150–200 г), крупа овсяная (250 г), сухофрукты (150 г), веник из свежих (зимой — сухих) веток деревьев и кустарников (малина, ива, береза, рябина, рододендрон), несколько видов видов свежей травы (таволга, крапива, бадан и др.).

По необходимости применялись подкормки из свежих фруктов и сухофруктов (яблоки и груши), грибов, лесного сена, витаминные добавки и соль-лизунец. Питательная вода всем животным давалась вволю в стандартных поилках, а зимой применялся снег. Животные содержались в контролируемых условиях среды Турочакского района республики Алтай. Освещение — естественное. Вновь прибывшие животные находились на 7-дневном карантине.

Основные оцениваемые параметры мониторинга здоровья кабарги: наличие протозойных заболеваний, гельминтозов и инфекционных заболеваний.

Инфекционные заболевания и методы их определения

Плановые серологические исследования являются основным методом выявления больных и подозрительных по заболеванию животных.

Для серологического исследования в лабораторию направляют сыворотку крови. Оценка гематологических показателей производится два раза в год во время сбора мускуса и пересадки животных. Для этого животные обездвиживаются, укладываются на бок, стреноживаются. Из ярёмной вены кровь берут в стерильную пробирку с антикоагулянтом кровопускательной иглой. Образцы этикетированы, готовятся к транспортировке.

Пастереллёз — бактериальная болезнь животных, проявляющаяся при остром течении септициемией, при подостром и хроническом — поражениями лёгких. Диагностика пастереллёза включает лабораторные исследования. В общем анализе крови при пастереллёзе выявляется лейкоцитоз с палочкоядерным сдвигом влево, увеличение СОЭ, нередко — тромбоцитопения, анемия. Изменения в биохимических показателях включают повышение АЛТ, АСТ, общего билирубина, С-реактивного белка, мочевины, креатинина, снижение

общего белка, нарушения со стороны свертывающей системы. Основной методикой является полимеразная цепная реакция (ПЦР). Бактериологические методы посева на питательные среды используются с любым биологическим материалом (отделяемое кожных язв, кровь, спинномозговая жидкость, пунктат абсцесса).

Для специфического лечения используют гипериммунные сыворотки против пастереллы крупного рогатого скота, буйволов, овец и свиней; сыворотку против пастереллы свиней, кроликов, пушных зверей. Для специфической профилактики болезни в России рекомендовано более 15-ти вакцин [21, 22].

Бруцеллез животных — антропозооноз, хронически протекающая болезнь, возбудителями которой выступают дикие стадные животные (олени, сайгаки, кабаны). Диагноз «бруцеллез» у животных ставят на основании результатов бактериологического, серологического, молекулярно-генетического и аллергического исследований с учетом эпизоотологических данных и клинических признаков болезни, руководствуясь при этом санитарными и ветеринарными правилами по профилактике и борьбе с заразными болезнями, общими для человека и животных [1]. Для исследования на бруцеллез животных разных видов применяют следующие методы:

а) серологический: реакция агглютинации в пробирках, реакция связывания комплемента или реакция длительного связывания комплемента, пластинчатая реакция агглютинации с Роз-Бен галантигеном — роз бенгал проба. Для серологического исследования в лабораторию направляют сыворотку крови;

б) ПЦР диагностика предназначена для выявления ДНК бактерий рода *Brucella* (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*) в биологическом материале от животных, не иммунизированных противобруцеллезными вакцинами, в случае аборта или проявления у них других признаков

(бурситы, гигромы, орхиты, эпидидимиты), вызывающих подозрение на бруцеллез, и (или) при получении положительных и сомнительных результатов исследования [2]. В районах, областях, краях и республиках со значительным распространением бруцеллеза животные в целях профилактики могут быть иммунизированы противобруцеллезными вакцинами в порядке, предусмотренном наставлениями соответствующих вакцин [1, 14].

Туберкулез — высококонтагиозное, хронически протекающее бактериальное заболевание, которому подвержены все виды теплокровных животных, дикие и домашние птицы. Относится к группе антропозоонозов. Представляет опасность для человека. Туберкулез протекает у взрослых животных преимущественно хронически, а у молодняка — остро или подостро. Диагноз «туберкулез» устанавливается на основании результатов комплексных исследований. Прижизненная диагностика включает:

а) оценку эпизоотологической обстановки и клинических признаков заболевания;

б) аллергический метод — туберкулинизация;

в) бактериологические исследования;

г) серологические исследования;

д) молекулярно-биологические исследования. ПЦР является одним из высокочувствительных и специфичных методов диагностики туберкулеза, особенно для высокоценных животных.

Инструкции по профилактическим мерам туберкулеза предоставляют ветеринарные центры региона [16].

Некробактериоз (некробациллез) — инфекционная болезнь домашних и диких животных, характеризующаяся гнойно-некротическими поражениями кожи и подлежащих тканей, слизистых оболочек и внутренних органов. Некробактериозом может заболеть и человек. Некробактериоз в стаде может быстро приобрести характер энзоотии, с охватом большого количе-

ства животных. Люди, не соблюдающие гигиенические правила, а также кровососущие и кусающие насекомые могут быть механическими переносчиками возбудителя некробактериоза. Оленей, в отличие от других животных, с учетом выраженной сезонности болезни, с профилактической целью вакцинируют ежегодно, однократно, за 1–2 мес. до активного лета и вылета жалящих насекомых [3].

Для создания пассивного иммунитета против сибирской язвы используется гипериммунная сыворотка или глобулин, который вводят животным в половинчатой дозе. Сейчас для профилактики сибирской язвы используют вакцину против сибирской язвы из штамма 55-ВНИИБВ и М. Вакцину выпускают в 4-х формах: лиофилизированную, жидкую, концентрированную, суперконцентрированную (применяют согласно инструкции). После введения вышеуказанных препаратов иммунитет у животных наступает сразу и длится до 10–14-ти дней [1, 15].

Бешенство у животных может проявляться по-разному, причем не всегда животное имеет больной вид. Агрессия или сильное беспокойство, выделение пенистой слюны, рвота и невозможность пить воду из-за судорог, а также параличи конечностей наблюдаются не у всех животных. Основные клинические признаки болезни у оленей: повышенная возбудимость, беспокойство и пугливость, которые позднее сменяются агрессивностью, попытками нападения на сородичей, собак и даже людей. Больные олени бегают по стаду, грызут сани, доски, другие предметы. Затем признаки буйства сменяются депрессией, шаткостью походки и параличом задних конечностей. Для борьбы с бешенством используют убитую антирабическую вакцину. С целью профилактики заболеваний людей, работникам, имеющим высокий риск заражения бешенством, должны проводиться обязательные профилактические прививки против бешенства [17].

Стоматит — воспаление слизистой оболочки ротовой полости, может быть катаральным, везикулярным, язвенным, дифтеретическим, флегмонозным и гангренозным. Первичные стоматиты возникают под действием механических, химических, термических и биологических факторов, а вторичные являются следствием других болезней (цинга, сахарный диабет, нефрит, гастроэнтерит, чума, ящур и др.). Нарушается прием корма, изо рта выделяется пенистая тягучая слюна, животное «чавкает», трётся мордой о грудные конечности, беспокоится, видны отёк слизистой и её дефектации (афты при ящуре, сыпи), иногда лихорадка, угнетение [8].

Методы определения неинфекционных заболеваний

Паразитирующая на обитателях лесов муха — оленья кровососка опасна и для животных, и для человека. Чаще всего этого паразита встречают впившимся в кожу лосей, оленей, косуль, кабанов, медведей. Бескрылое насекомое живёт на теле животного примерно в течение полугода. Избавиться от паразитов лесные обитатели могут только к началу лета, когда жизненный цикл кровососки завершается. Личинки носоглоточного овода (сяну) травмируют своими шипами слизистую оболочку носа и вызывают воспаление, которое осложняется патогенной микрофлорой и переходит в гнойно-некротическое. Животные не могут принимать корм и быстро двигаться, при попадании личинок в трахею развивается аспираторная одышка и интоксикация организма. Таёжный клещ (*Ixodes persulcatus*) — один из представителей самых опасных видов кровососущих паразитов. Зона обитания таёжного клеща преимущественно расположена в тайге, во влажных густых лесах, но столкнуться с паразитом можно также в горах, парках, лугах, полянах, оврагах. Самые страшные заболевания, возникающие от укуса зараженного клеща:

клещевой энцефалит, болезнь Лайма, тиф, лихорадка Ку, туляремия [4].

Общий анализ крови и лейкоцитарная формула используются для того, чтобы определить, является ли гельминтоз или паразитоз инвазивным, и также позволяет выявить возможные осложнения, связанные с инфекцией. Об инвазивности гельминтозов и паразитозов свидетельствует эозинофилия. Она характерна для амебиаза, эхинококкоза, описторхоза, токсокароза, трихинеллёза и аскаридоза (в фазу миграции личинок).

Биохимический анализ крови — это метод стандартной лабораторной диагностики, позволяющий оценить работу внутренних органов. Биохимия крови помогает в постановке окончательного диагноза, определении прогноза заболевания, мониторинге болезни, контроле течения и результатов лечения, скрининге, т.е. выявлении болезни на доклинической стадии. Стандартный биохимический анализ крови отражает состояние белкового, углеводного, липидного и минерального обмена, а также активность некоторых ключевых ферментов сыворотки крови.

Проведение регулярной клинической диагностики здоровья кабарги осложняется поведенческими особенностями животного, в связи с чем разработана неинвазивная система мониторинга здоровья.

В вольерах проводятся гельминтологические (копрологические) обследования. Для гельминтологического анализа собираются свежие экскременты (5–10 шт. в пробе). Каждая проба помещается в отдельный пластиковый пакет и этикируется. Пробы направляются в ветеринарную лабораторию.

Анализ экскрементов на яйца гельминтов и анализ экскрементов на цисты простейших включают макроскопическую оценку (цвет, консистенция, наличие крови, избытка слизи, макроскопически определяемых паразитов), микроскопию нативного образца экскрементов (наличие цист простейших — трофозоитов, личинок и взро-

слых особей гельминтов) и микроскопию окрашенного мазка экскрементов (наличие цист и трофозоитов). Анализ экскрементов на яйца гельминтов позволяет выявить большинство кишечных нематод, цестод и трематод. Учитывая, что поступление яиц гельминтов или цист простейших в экскременты может носить непостоянный характер, однократное исследование экскрементов малоинформативно и рекомендуется исследование трех образцов из одной вольеры или от одного животного, собранных в течение недели. Отрицательный результат копрологических исследований не позволяет полностью исключить наличие гельминтоза или паразитоза.

Результаты и их обсуждение

Все ветеринарные манипуляции с животными проводятся под руководством квалифицированного ветеринарного врача.

Контролировать состояние здоровья вольерной кабарги необходимо каждый день визуально. Любое отклонение от естественного поведения является косвенным признаком заболевания. Как правило, больные животные вялые, горбятся, чаще лежат. Для них характерны дрожь, паралич задних конечностей, обильные выделения мокроты из слизистых. Таких животных необходимо изолировать для спокойного проведения лечения. Для этого при планировании вольер отдельно строятся санитарные вольеры-изоляторы. Изолятор должен примыкать к основному вольерному комплексу для более удобного перевода в них больного животного. Если заболевание заразное и может передаваться воздушным путем, то животных из смежной с изолятором вольеры переводят в дальнюю вольеру. Изоляторы пристраивают с подветренной стороны или соединяют с другими вольерами с помощью перегонного коридора.

Лекарственные средства применяют в зависимости от назначения ветеринарного врача. Пероральные препараты (растворы, таблет-

ки, дезинфицирующие желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) препараты) кабарге дают с концентрированными кормами или добавляя в питьё. Внутримышечные инъекции делают в область крупа, подкожные — в область грудной клетки. Внутривенные — в яремную вену на шее [5].

Антигельминтики применяются с подкормкой. После проведения дегельминтизации кабаргу перемещают в другую незараженную вольеру, а в первой вольере проводится обработка. Перед подачей антигельминтика и после необходимо делать анализ экскрементов. Возможно проведение дегельминтизации во время первичной передержки перед транспортировкой [20].

Дегельминтизацию кабарги проводят с помощью препарата **панакур**. Он является эффективным и проверенным препаратом для профилактики и лечения гельминтозов оленей. Панакур задают в кормушки однократно, в смеси со 100 г слегка увлажненной овсянки. Дозу панакура гранулята (9 мг/кг фенабендазола) берут из расчета на 10 кг массы животного. Зерно с препаратом кабарга обычно поедает полностью и с аппетитом. Отклонений в общем поведении животных не наблюдается. Эффективность панакура гранулята при диктиокаулезе и стронгилятозах пищеварительного тракта кабарги составляет 100%. Дегельминтизацию панакуром также проводят два раза в год (в течение первых дней весны и первых дней осени). Панакур дается с пищей — концентрированными кормами (овсяная крупа), три дня подряд. Для дегельминтизации также можно использовать препараты **альбент**, **альбендазол** и очень эффективен **тиабендазол**, из расчета 250 мл/кг массы тела. Эти препараты обладают комплексным действием и одновременно действует на трематод, цестод и нематод.

Для снижения инвазии и ограничения распространения гельминтов рекомендуется закладывать в солонцы вольер **фенотиазин** или др. антигельминтные препараты.

Для борьбы с эктопаразитами проводят раннюю (август) и позднюю (март — апрель) химиотерапию. Применяют инсектициды, репелленты и акарицидные средства. **Энтомозан-С** является эффективным инсекто-акарицидным средством контактного действия, активен в отношении саркоптоидных, иксодовых, куриных, кошарных клещей, вшей, блох, власоедов, кровососок, клопов, мух, гнуса и др. Отловленную вольерную кабаргу обрабатывают 0,01% водной эмульсии из расчета 2–4 л на животное при псороптозе двукратно с интервалом 10–14 дней, против иксодовых клещей — в течение всего пастбищного сезона с интервалом 9–10 дней, с помощью беспропеллентного баллона на шерстяной покров кабарги, избегая попадания препарата на слизистые оболочки. В рекомендуемых дозах препарат не оказывает токсичного действия [6].

Погибших животных (в вольерах, после выпуска) подвергают ветеринарному осмотру: производят патологоанатомическое вскрытие для точного определения причин смерти и обследование методом полного гельминтологического вскрытия. Погибших животных также взвешивают, снимают все промеры: если у них до этих пор не был определен пол, то определяют. Составляют акт, в котором указывается дата смерти, пол и возраст животного, номер метки и причина смерти.

Для борьбы с инфекционными заболеваниями в соответствии с принятыми стандартами ветеринарии применяют соответствующие лекарственные средства.

С лечебной целью больным пастереллёзом животным вводят иммунную **противопастереллёзную сыворотку** и один из следующих антибиотиков: **окситетрациклин**, **хлорокситетрациклин**, **стрептомицин**, **левомицитин**, пролонгированные антибиотики (**дибимицин**, **дитетрациклин**, **бициллин-3**) [10].

Специфическое действие на возбудителя некробактериоза оказывает **дибимицин**,

который вводят внутримышечно в область бедра в дозе 20 тыс. ед. на 1 кг массы тела животного. Однократное введение создает в организме больного животного терапевтическую концентрацию в течение 7-ми дней. При запущенных формах болезни дибиомицин вводят повторно на 6–8-й день. Дибиомицин применяют в виде суспензии на 30%-ном глицерине, приготовленном на 0,5–1% р-ре новокаина. В последнее время при некробактериозе себя хорошо зарекомендовали новые лекарственные препараты: **кламоксил**, **террамицин**. Антибиотики необходимо назначать после проведенной титрации на чувствительность в ветеринарной лаборатории. Из дезинфицирующих, окисляющих средств применяют **3–5% р-р перекиси водорода**, **0,1–0,2% р-р марганцовокислого калия**, **р-р фурацилина 1:5000**, **0,5% р-р хлорамин** и др. [11].

Лечение животных, у которых диагностирована любая форма туберкулёза, не предусмотрено, больных особей направляют на убой, трупы утилизируют согласно установленным санитарно-гигиеническим нормам. Однако для особо ценных животных предусмотрено лечение **тубазилом** и **фтивазином** в общепринятых дозах.

Важнейшим условием избегания заразных заболеваний являются **профилактические меры**, как то: чистая одежда и обувь у сотрудников при посещении вольер (например, для кормления), исключение контакта персонала с домашними и сельскохозяйственными животными, обработка входов в вольеры дезинфицирующими средствами (ветеринарные коврики) и т. д. [13].

Лечение незаразных болезней — например, стоматита — подбирают исходя из этиологии и симптоматики: исключают раздражение слизистой (жидкие корма: кисели, каши, отвары). Ротовую полость орошают **р-ром питьевой соды**, **фурацилином 1:5000**, **настояем цветков ромашки**, **листьев шалфея**, **череды**, **солодий**

ольхи, **афты**, обрабатывают **3% р-ром перекиси водорода** [18].

Для профилактики травм, связанных с агрессией самцов во время гона, животных, подвергающихся агрессии, отсаживают и перегоняют в другие вольеры. Особо агрессивных самцов следует держать отдельно и ссаживать с самками только на период гона [23].

От загрязнения ран зафиксированы несколько случаев столбняка. Во всех случаях животных удалось спасти, вовремя применив комплекс инъекций, состоящий из **поливалентной противостолбняковой вакцины** (2 мл) и однократной дозы антибиотика **амоксцициллина** 15% (1,5 мл).

Для молодых животных характерны фатальные травмы позвоночника, в основном перелом атланта, полученные при неосторожных столкновениях с различными препятствиями (наклонные деревья, пни и пр.) в вольерах [12].

При необходимости искусственной выпойки телят необходимо постоянно следить за состоянием (консистенцией) экскрементов телят, т.к. в этот период могут возникнуть расстройства ЖКТ. Во время расстройства кишечника экскременты становятся жидкими или кашеобразными. В этих случаях следует пропустить одно кормление, а в следующее кормление дать животному смесь из более слабой концентрации **заменителя цельного молока** (ЗЦМ) или сырого яйца и воды. Если функции кишечника не восстановятся, теленку можно дать **трибрисен**, оказывающий хороший терапевтический эффект в подобных случаях. Возможно также применение следующих препаратов: **фуразолидон** — по 2 таблетки 0,05 г 3 раза в день; **энтеросептол** — по 1 таблетке 3 раза в день; **интестопан** — по 1 таблетке 3 раза в день. При сильном поносе — **неомицин**, 3 раза в день по 2,5 г два дня подряд, а потом за 15 мин до кормления. Для выпаивания оптимальным продуктом является козье молоко. В случаях

выпаивания цельным коровьим молоком при возникновении расстройств ЖКТ помогает перевод на кормление ЗЦМ с ежедневной добавкой **витаминов А, Д, Е**. При вздутиях живота дается разведенный водой **крахмал, активированный уголь** (1–3 таблетки на прием), **белая глина** (0,5 чайной ложки), **молочная кислота** (10 капель). В профилактических и лечебных целях можно применять вместо питьевой воды **отвары осиновой коры**. Для предупреждения желудочно-кишечных заболеваний и улучшения аппетита рекомендуется также поить телят **сенным настоем**. Он готовится из хорошего разнотравного сена.

Чрезвычайно важным мероприятием во время искусственной выпойки является регулярный массаж тела телят (мягким жгутом из соломы, тряпкой или просто рукой), который в известной мере заменяет им массаж языком матери. При этом особое значение имеет растирание в области анального отверстия и наружных половых органов, без чего у многих телят не наступают нормальная дефекация и мочеиспускание. На первых порах выпойки полезно применять облучение телят кварцевой лампой. Ослабевшим телятам можно делать клизму из раствора **глюкозы** [19].

Заключение

Кабарга — животное, представляющее исключительную ценность как продуцент высококачественного мускуса, чем обусловлена необходимость отработки надлежащих ветеринарных тактик их вольерного содержания.

В связи с образом жизни и поведенческими особенностями животного, осложняющими регулярную клиническую диагностику, разработана система неинвазивного мониторинга здоровья и определены критерии фитотерапевтической и фармакологической профилактики и лечения кабарги в условиях вольера.

Основные оцениваемые параметры мониторинга здоровья кабарги: наличие гельминтозов, протозойных и инфекционных заболеваний.

Дегельминтизацию кабарги проводят с помощью препаратов панакур, альбент, альбендазол, тиабендазол, фенотиазин и др. антигельминтных препаратов. При заражении эктопаразитами используется энтомозан-С.

Для борьбы с инфекционными заболеваниями, среди которых наиболее опасными для кабарги являются сибирская язва, бруцеллёз, сальмонеллёз, некробациллёз, пастереллёз, туберкулёз и ящур, применяются поливалентная противостолбняковая вакцина, противопастереллёзная сыворотка, тубазид, фтивазин, амоксициллин, окситетрациклин, хлорокситетраиклин, стрептомицин, левомицетин, пролонгированные антибиотики (дифеницилин, дитетрациклин, бициллин-3), кламоксил, тетрациклин, 3–5% р-р перекиси водорода, 0,1–0,2% р-р марганцовокислого калия, р-р питьевой соды, р-р фурацилина 1:5000, 0,5% р-р хлорамина, настой цветков ромашки, листьев шалфея, череды, соплодий ольхи, афты и др.

Важнейшим условием избегания заразных заболеваний являются профилактические меры.

При расстройствах ЖКТ, особенно в период вскармливания молодых телят, применяются заменитель цельного молока с сырым яйцом и водой, глюкоза, трибисен, фуразолидон, энтеросептол, интестопан, неомицин, белая глина, молочная кислота, отвар осиновой коры, сенный настой, витамины А, Д, Е. Во время искусственной выпойки применяются массаж тела телят и облучение кварцевой лампой.

Оценка влияния фармакологических и фитотерапевтических средств на качество мускуса служит предметом дальнейших исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Ветеринарные правила ВП 13.3.1302-96 (с изм. от 12.07.2010). [Veterinariye pravila [Veterinary rules] VP 13.3.1302-96 (as amended on 12.07.2010). (In Russian)].
2. Ветеринарные правила ВП 13.3.1325-96. [Veterinariye pravila [Veterinary rules] VP 13.3.1325-96. (In Russian)].
3. Ветеринарные правила ВП 13.4.1313-00. [Veterinariye pravila [Veterinary rules] VP 13.4.1313-00. (In Russian)].
4. Водянов А.А., Луцук С.Н. *Морфология, биология и лабораторная диагностика возбудителей инвазионных болезней животных: уч.-метод. пособ.* Ставрополь: АГРУС Ставропольского гос. Аграрного ун-та, 2014:220. [Vodyanov A.A., Lutsuk S.N. *Morfologiya, biologiya i laboratornaya diagnostika vzbuditeley invazionnykh bolezney zhivotnykh: uch.-metod. posob. [Morphology, biology and laboratory diagnostics of causative agents of invasive animal diseases: study-method. manual].* Stavropol': AGRUS Stavropol'skogo gos. Agrarnogo un-ta, 2014:220. (In Russian)].
5. Волков Г.Л., Самохин В.Т., Юдин А.И. *Ветеринарные советы.* М.: Агропромиздат, 1990:176. [Volkov G.L., Samokhin V.T., Yudin A.I. *Veterinariye sovety [Veterinary advice].* Moscow: Agropromizdat Publ., 1990:176. (In Russian)].
6. Дьяконов Л.П., Орлов И.В., Абрамов И.В. и др. *Паразитарные болезни сельскохозяйственных животных.* М.: Агропромиздат, 1985:383. [D'yakonov L.P., Orlov I.V., Abramov I.V. i dr. *Parazitarnyye bolezni sel'skokhozyaystvennykh zhivotnykh [Parasitic diseases of farm animals].* Moscow: Agropromizdat Publ., 1985:383. (In Russian)].
7. *Европейская и сибирская косули. Систематика, экология, поведение, рациональное использование:* Сб. М.: Наука, 1992. [Evropeyskaya i sibirskaya kosuli. Sistematika, ekologiya, povedeniye, ratsional'noye ispol'zovaniye: Sb. [European and Siberian roe deer. Systematics, ecology, behavior, rational use: Collection]. Moscow: Nauka Publ., 1992. (In Russian)].
8. Забродин В.А., Казановский Е.С. Ветеринарные проблемы северного оленеводства Европейского Севера. *Аграрная Россия.* 2000;3:43–46. [Zabrodin V.A., Kazanovskiy E.S. Veterinariye problemy severnogo olenevodstva Yevropeyskogo Severa [Veterinary problems of northern reindeer husbandry in the European North]. *Agrarian Russia.* 2000;3:43–46. (In Russian)].
9. Закон РФ от 14.05.1993 г. № 4979-1 «О ветеринарии» (с изм. и доп.). [Law of the Russian Federation of May 14, 1993. No. 4979-1 «O veterinarii» ["On Veterinary Medicine"] (with amendments and additions). (In Russian)].
10. *Инфекционные болезни животных: Справ. / Сост. Ю.Ф. Борисевич, Л.В. Кириллов; Под ред. Д.Ф. Осидзе. М.: Агропромиздат, 1987:288. [Infektsionnyye bolezni zhivotnykh: Sprav. [Infectious diseases of animals: Handbook]. Comp. Yu.F. Borisevich, L.V. Kirillov; Ed. by D.F. Osidze. Moscow: Agropromizdat Publ., 1987:288. (In Russian)].*
11. *Общая и клиническая ветеринарная рецептура: Справ. / Под общ. ред. В.Н. Жуленко. М.: Колос, 1998:551. [Obshchaya i klinicheskaya veterinarnaya retseptura: Sprav. [General and clinical veterinary recipe: Handbook]. Under total. ed. V.N. Zhulenko. Moscow: Kolos Publ., 1998:551. (In Russian)].*
12. Приходько В.И. *Кабарга: происхождение, систематика, экология, поведение и коммуникация.* М.: ГЕОС, 2003:443. [Prikhod'ko V.I. *Kabarga: proiskhozhdeniya, sistematika, ekologiya, povedeniye i kommunikatsiya [Musk deer: origin, taxonomy, ecology, behavior and communication].* Moscow: GEOS Publ., 2003:443. (In Russian)].
13. Приходько В.И. *Разведение кабарги: Научн.-практ. реком.* М.: Товарищество научных изданий КМК, 2008:142. [Prikhod'ko V.I. *Razvedeniye kabargi: Nauchn.-prakt. rekom. [Breeding of musk deer: Scientific-practical. recom.].* Moscow: Tovarithchestvo nauchnykh izdaniy KMK Publ., 2008:142. (In Russian)].
14. Санитарные правила СП 3.1.085-96. [Sanitarnyye pravila [Sanitary rules] SP 3.1.085-96. (In Russian)].
15. Санитарные правила СП 3.1.089-96. [Sanitarnyye pravila [Sanitary rules] SP 3.1.089-96. (In Russian)].
16. Санитарные правила СП 3.1.093-96. [Sanitarnyye pravila [Sanitary rules] SP 3.1.093-96. (In Russian)].
17. Санитарные правила СП 3.1.096-96. [Sanitarnyye pravila [Sanitary rules] SP 3.1.096-96. (In Russian)].
18. Уша Б.В., Фельдштейн М.А. *Первая помощь животным при незаразных болезнях.* 2-е изд., перераб. и дополн. М.: Агропромиздат, 1988:240. [Usha B.V., Fel'dshteyn M.A. *Pervaya pomoshch' zhivotnym pri nezaraznykh boleznyakh [First aid to animals for non-communicable diseases].* 2nd ed., rev. and additional. Moscow: Agropromizdat Publ., 1988:240. (In Russian)].
19. Фалеев В.И., Чечушков М.А., Зуйков А.А., Абрамов С.А., Литвинов Ю.Н. Опыт содержания и размножения сибирской кабарги в Горном Алтае. *Зоол. журн.* 2000;79(5):608–614. [Faleyev V.I., Chchushkov M.A., Zuykov A.A., Abramov S.A., Litvinov YU.N. Opyt sodержaniya i razmnozheniya sibirskoy kabargi v Gornom Altaye [Experience of keeping and breeding Siberian musk deer in Gorny Altai]. *Zoological J.* 2000;79(5):608–614. (In Russian)].
20. Чечушков М.А., Капанадзе Г.Д., Петрова Н.В., Ревякин А.О. Таксономическая характеристика кабарги (*Moschus moschiferus*), разработка и совершенствование методов ее отлова в дикой природе. *Биомедицина.* 2017;4:4–18. [Chchushkov M.A., Kapanadze G.D., Petrova N.V., Revyakin A.O.

- Taksonomicheskaya kharakteristika kabargi (Moschus moschiferus), razrabotka i sovershenstvovaniye metodov yeye otlova v dikoy prirode [Taxonomic characteristics of musk deer (Moschus moschiferus), development and improvement of methods for catching it in the wild]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2017;4:4–18. (In Russian)].
21. Чужебаева Г.Д. *Диагностика пастерелллёза крупного рогатого скота методом ПЦР*. Костанай: Костанайский государственный университет имени Ахмета Байтурсынова, 2017:106. [Chuzhebayeva G.D. *Diagnostika pasterelleza krupnogo rogatogo skota metodom PTsR [Diagnosis of pasteurellosis in cattle by PCR]*. Kostanay: Kostanayskiy gosudarstvennyy universitet imeni Akhmeta Baytursynova, 2017:106. (In Russian)].
22. Шевченко А.А., Черных О.Ю., Шевченко Л.В., Джаилиди Г.А., Зеркалев Д.Ю., Горпинченко Е.А. *Диагностика пастерелллёза: Уч. пособ.* Краснодар: КубГАУ, 2013:12. [Shevchenko A.A., Chernykh O.Yu., Shevchenko L.V., Dzhaillidi G.A., Zerkalev D.Yu., Gorpinchenko E.A. *Diagnosis of pasteurellosis: Textbook*. Krasnodar: KubGAU Publ., 2013:12. (In Russian)].
23. Wang J.L., Huang H.M. The relationship between the pituitary hormones which stimulate the sex glands and the secretion of mask. *The protection and Use of Wildlife*. Chine, 1980;1:19–21.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

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

e-mail: borisova_mm@mail.ru

Чечушков Михаил Алексеевич, ассоциация «Центр поддержания популяции редких видов животных “Алтайэкоосфера”»;

e-mail: volker61@mail.ru

Табоякова Лидия Александровна, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;

e-mail: lida-vet@mail.ru

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

e-mail: borisova_mm@mail.ru

Mikhail A. Chechushkov, Association «Center for Maintaining the Population of Rare Species of Animals “Altayekosfera”»;

e-mail: volker61@mail.ru

Lidiya A. Taboyakova, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: lida-vet@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

<https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-1-35-42>



СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИОННЫХ КАНАЛОВ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ИХ АКТИВНОСТИ

Е.И. Бонь*, Н.Е. Максимович

УО «Гродненский государственный медицинский университет»
230009, Республика Беларусь, Гродно, ул. Горького, 80

Ионные каналы клетки представляют собой сложные белковые структуры с молекулярными системами открытия, закрытия, селективности, инактивации и регуляции. Цель данного обзора — обобщение и систематизация данных литературы о структурно-функциональных характеристиках ионных каналов и методах исследования их активности. Нарушения их активности могут привести к изменению функционирования клетки и всего организма в целом, поэтому дальнейшее исследование структурных и физиологических характеристик ионных каналов перспективно и актуально.

Ключевые слова: ионные каналы, методические подходы к определению

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Бонь Е.И., Максимович Н.Е. Структурно-функциональная характеристика ионных каналов и методы исследования их активности. *Биомедицина*. 2021;17(1):35–42. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-1-35-42>

Поступила 09.03.2020

Принята после доработки 01.06.2020

Опубликована 10.03.2021

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF ION CHANNELS AND METHODS FOR INVESTIGATING THEIR ACTIVITY

Elizaveta I. Bon*, Nataliya Ye. Maksimovich

Grodno State Medical University
230009, Republic of Belarus, Grodno, Gorkogo Street, 80

Ion channels are complex protein structures comprising the molecular systems of opening, closing, selectivity, inactivation and regulation. This review article aims to generalize and systematize literature data on the structural and functional characteristics of ion channels and methods for investigating their activity. Violations of the activity of ion channels may alter the functioning of both individual cells and the entire organism. Therefore, further research into the structural and physiological characteristics of ion channels can be considered promising and relevant.

Keywords: ion channels, methodological approaches, definition

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

For citation: Bon E.I., Maksimovich N.Ye. Structural and Functional Characteristics of Ion Channels and Methods for Investigating Their Activity. *Journal Biomed*. 2021;17(1):35–42. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-1-35-42>

Submitted 09.03.2020

Revised 01.06.2020

Published 10.03.2021

Ионные каналы клетки представляют собой сложные белковые структуры с молекулярными системами открытия, закрытия, селективности, инактивации и регуляции. Они выполняют целый ряд функций. Многие модуляторы метаболизма клетки также оказывают свое действие через ионные каналы. Обеспечивая транспорт ионов и воды через мембрану, внутриклеточную концентрацию ионов кальция, они регулируют pH и объем клетки. Часто являясь рецепторами, каналы включены в системную регуляцию функций отдельных клеток, органов и систем организма в целом. Особое значение ионные каналы имеют в возбудимых клетках. Они обеспечивают формирование мембранного потенциала (МП) покоя, возбудимость, а также активную или пассивную деполяризацию, инициируют выделение гормонов и сокращение мышечных волокон. Активность ионных каналов лежит в основе генерации и распространения потенциала действия в нейронах, необходимы для передачи возбуждающих и тормозных импульсов. Ионные каналы принимают участие в процессах передачи информации с одной нервной клетки на другую, включая экзоцитоз синаптических везикул с выделением медиатора и его взаимодействие с рецепторами постсинаптической мембраны, обеспечивают тонкую настройку пре- и постсинаптической активности путем обратных связей и ретроградных сигналов. Эти процессы лежат в основе сложнейших интегративных функций мозга, кратковременной и долговременной синаптической пластичности, участвуя в механизмах памяти [1, 4, 5, 23, 27]. Белки, образующие каналы, являются трансмембранными, и их внеклеточные участки и сама пора канала доступны для действия внеклеточных химических агентов, как естественных, так и искусственных (фармакологических). Поэтому изучение молекулярных механизмов блокады ионных каналов необходимо для фармакологии и медицины в целом.

Одной из основных проблем современной фармакологии является недостаток информации о молекулярных основах действия препаратов. Для того чтобы предсказать действие тех или иных препаратов в физиологических и патологических условиях, необходимо изучать структуру ионных каналов и механизмы их взаимодействия с лигандами на молекулярном уровне [19].

Цель данного обзора — обобщение и систематизация данных литературы о структурно-функциональных характеристиках ионных каналов и методах исследования их активности.

Основные типы ионных каналов. Все каналы возбудимых клеток можно разделить на два основных типа. Первый тип — **каналы покоя**, которые спонтанно открываются и закрываются без внешних воздействий. Они важны для генерации МП покоя. Второй тип — т.н. **воротные каналы (gate-каналы)**. В покое эти каналы закрыты и могут открываться под действием тех или иных раздражителей, которые действуют непосредственно на канал или через систему вторичных посредников. Некоторые разновидности таких каналов принимают участие в генерации электрических сигналов возбудимых клеток, потенциалов действия (ПД), синаптических и рецепторных потенциалов [1, 15].

Большинство ионных каналов характеризуются избирательностью (селективностью), т. е. через определенный вид каналов проходят только конкретные ионы. По этому признаку различают натриевые (Na), калиевые (K), кальциевые (Ca), хлорные (Cl) каналы. Селективность каналов определяется размерами поры, иона и его гидратной оболочки, зарядом иона, а также зарядом внутренней поверхности канала. Неселективные каналы могут пропускать сразу несколько различных ионов, например калий и натрий или хлор и калий. Встречаются каналы, через которые могут

проходить все ионы и более крупные молекулы [3, 7, 9, 10, 13–15].

Ионный канал характеризуется двумя состояниями: открытым и закрытым, причем переход из одного состояния в другое происходит мгновенно, открытие — только на определенное время. Время открытого состояния канала меняется случайным образом, но его среднее время — характерная величина для данного вида каналов.

Некоторые ионные каналы в покое открываются достаточно часто, и вероятность нахождения таких каналов в открытом состоянии в неактивированной клетке относительно высока. Активация таких каналов адекватным раздражителем резко увеличивает вероятность их открытия.

По способу активации все известные ионные каналы можно разделить на четыре группы. Некоторые каналы специфически отвечают на физические изменения в клеточной мембране нейрона. Наиболее яркими представителями этой группы являются **потенциал-активируемые каналы**. Примерами являются чувствительные к потенциалу на мембране К-, Na-, Са-каналы, которые отвечают за формирование ПД, открываясь при достижении определенного потенциала на мембране [22, 25].

К группе каналов, активирующихся физическими изменениями, относятся **механочувствительные каналы**, реагирующие на механические воздействия (растяжение или деформацию клеточной мембраны) [11].

Ионные каналы другой группы, **лиганд-активируемые**, открываются, когда химические вещества активируют специальные рецепторные связывающие центры на молекуле канала. Такие каналы подразделяются на две подгруппы в зависимости от того, являются ли их рецепторные центры внутри- или внеклеточными.

Лиганд-активируемые каналы, отвечающие на внеклеточные стимулы, называют также **ионотропными рецепторами**. Они включают каналы, чувствительные

к нейромедиаторам, и принимают непосредственное участие в передаче информации в синаптических структурах.

Лиганд-активируемые каналы, активирующиеся с цитоплазматической стороны, чувствительны к изменениям концентрации специфических ионов и внутриклеточных лигандов. Например, Са-активируемые К-каналы активируются локальным повышением концентрации внутриклеточного кальция. Такие каналы играют важную роль в реполяризации клеточной мембраны во время завершения ПД.

Кроме ионов Ca^{2+} , типичными представителями внутриклеточных лигандов являются циклические нуклеотиды. Циклический ГМФ отвечает за активацию Na-каналов в палочках сетчатки, играя важную роль в работе зрительного анализатора.

Классификация каналов по способу активации в значительной степени условна. Некоторые ионные каналы могут активироваться только при нескольких воздействиях. Например, Са-активируемые К-каналы чувствительны также к изменению потенциала, а некоторые потенциал-активируемые ионные каналы чувствительны к внутриклеточным лигандам [1, 21].

Метаботропные рецепторы представляют собой комплекс белков, состоящий из собственно **рецепторного белка**, связывающегося с нейромедиатором, **G-белка**, который при активации взаимодействует с **эффectorными белками** — ферментами или ионными каналами, изменяя их активность. В неактивной форме G-белок существует в виде $\alpha\beta\gamma$ -гетеротримера, связывающего гуанидиндифосфат (ГДФ). При связывании рецепторного белка с лигандом происходит активация α -субъединицы, которая имеет высокое сродство к гуанидинтрифосфату (ГТФ) и низкую аффинность к $\beta\gamma$ -комплексу. В результате α -субъединица освобождает ГДФ, присоединяет ГТФ и отсоединяется от $\beta\gamma$ -димера.

В состоянии комплекса с ГТФ α -субъединица активирует или ингибирует

различные внутриклеточные ферменты — такие, как фосфолипаза A_2 , катализирующая высвобождение арахидоновой кислоты, аденилатциклаза, катализирующая синтез цАМФ из АТФ, гуанилатциклаза, катализирующая синтез цГМФ из ГТФ, фосфолипаза C, расщепляющая фосфатидилинозитол-4,5 — дифосфат мембраны на инозитол-1,4,5-трифосфат ($ИФ_3$) и диацилглицерол (ДАГ).

В результате изменяется уровень вторичных посредников — ионов Ca^{2+} , цАМФ, цГМФ, $ИФ_3$ и ДАГ, что приводит к активации соответствующих протеинкиназ: цАМФ-зависимых протеинкиназ (А-киназ), цГМФ-зависимых протеинкиназ (G-киназ), Са-кальмодулин-зависимых протеинкиназ (В-киназ) и Са-фосфолипид-зависимых протеинкиназ (С-киназ). Активация протеинкиназ обуславливает фосфорилирование ионных каналов и может инициировать их открытие или закрытие. В некоторых случаях $\beta\gamma$ -димер может взаимодействовать с субъединицами ионных каналов, обуславливая стимулирование или ингибирование их активности. В этом случае G-белок непосредственно взаимодействует с ионными каналами. В отличие от ионотропного рецептора, метаботропный рецептор способен контактировать последовательно со многими десятками и сотнями молекул G-белка, которые, в свою очередь, активируют большое количество молекул фермента, приводя к резкому усилению ответа. Это приводит к активации большого количества ионных каналов и продолжительному физиологическому ответу [17, 20, 24, 26].

Иногда адекватный стимул может деактивировать ионные каналы, бывшие активными в покое. Активация или деактивация канала означает возрастание или снижение вероятности его открытия, а не увеличение или уменьшение времени открытого состояния канала.

Кроме процессов активации и деактивации, ионный ток через канал регулируется другими процессами. Ионный канал может

переходить в конформационное состояние, в котором обычный активирующий стимул не способен вызвать открытие канала. Для ионных каналов, активируемых потенциалом, такое состояние называется *инактивацией*. По скорости инактивации различают быстро инактивирующиеся и медленно инактивирующиеся ионные каналы. Для каналов, отвечающих на химические стимулы, это состояние известно как *десенситизация*.

Прекращение ионного тока через канал может возникнуть также при *блоке открытого канала*. Такое происходит, если крупная молекула связывается с ионным каналом и закрывает пору. Другим примером является блокирование каналов ионами магния или кадмия. Эти катионы, связываясь с каналом в области его устья, препятствуют проникновению других катионов.

Каждый канал характеризуется проводимостью и проницаемостью. Величина тока, проходящего через ионный канал, является прямым отражением скорости движения заряженных ионов.

Проводимость ионного канала зависит от двух факторов: *проницаемости* канала и концентрации ионов около устья. В отсутствие ионов ток отсутствует.

Проницаемость канала определяется особенностями прохождения ионов через канал. Одним из возможных механизмов движения ионов является диффузия через водную среду, заполняющую пору канала. Проникающие ионы вступают во взаимодействие с белками ионного канала. В растворе, благодаря наличию заряда, ионы всегда покрыты гидратной оболочкой. Если пора ионного канала узкая, необходимо некоторое количество энергии, чтобы освободить ион от ассоциированных молекул воды и позволить ему проникнуть через этот участок. В канале ион может быть объектом притяжения или отталкивания зарядами стенки канала. Взаимодействие иона со стенками ионного канала может приводить к своеобразным «перескокам»

иона с одного центра связывания на другой. Такие взаимодействия иона могут влиять на ионную избирательность и на проницаемость ионных каналов [2, 11, 27].

Движение ионов через открытый канал (проводимость). Передвижение ионов в канале обеспечивается наличием двух движущих сил: химической и электрической. *Химическая движущая сила* определяется разностью концентраций ионов снаружи и внутри клетки. Концентрация ионов снаружи и внутри клетки неодинакова, что связано с работой специальных мембранных транспортных систем-переносчиков (насосов). *Электрическая движущая сила* зависит от потенциала на мембране. Если К-канал открыт, а на мембране существует концентрационный градиент для калия, то ионы K^+ начинают двигаться через канал и выходят из клетки. Ионы K^+ несут положительные заряды, поэтому снаружи мембрана заряжается положительно, а потеря положительных зарядов клеткой ведет к появлению отрицательного заряда на внутренней поверхности мембраны. В результате этого на мембране формируется разность потенциалов (с отрицательным зарядом внутри), в результате чего возникает электрическая движущая сила, которая заставляет ионы K^+ входить в клетку. В результате химическая сила уравнивается электрической, и движение ионов K^+ через канал прекращается. Электрический потенциал на мембране, который прекращает движение ионов K^+ через К-канал по градиенту концентрации, носит название *равновесного потенциала* для калия. Для ионов Na^+ , Ca^{2+} и Cl^- в мембране есть селективные каналы. Равновесный потенциал зависит только от концентрации ионов по обе стороны мембраны [1, 5].

Принципы молекулярной организации ионных каналов. Применение современных методов исследования позволило определить молекулярную структуру большинства известных ионных каналов и выявить функциональное значение их элементов.

Любой канал состоит из нескольких структурно-функциональных частей, отвечающих за открытие, закрытие, селективность, инактивацию, регуляцию.

Порообразующая часть ионного канала представляет собой полипептид, организованный в виде нескольких идентичных трансмембранных доменов, или несколько белковых субъединиц, которые могут быть как одинаковы, так и различны по структуре. Все каналы в составе порообразующих субъединиц имеют регуляторные домены, связывающиеся с различными регуляторными молекулами.

Каналы обладают свойством селективно пропускать ионы, которое реализуется в самом узком месте канала, т.н. *селективном фильтре*. Катион-селективные каналы часто имеют негативно заряженные остатки в области селективного фильтра, которые притягивают положительные и отталкивают отрицательные ионы.

Многие ионные каналы имеют одну или более *вспомогательных субъединиц*, которые играют модуляторную, структурную или стабилизирующую роль. Эти субъединицы можно подразделить на два основных класса. Один класс состоит из полностью цитоплазматических внутриклеточных субъединиц, не имеющих трансмембранных доменов, другой — содержит один или несколько трансмембранных доменов [1, 27].

Регуляция ионных каналов

Активность ионных каналов может регулироваться целым рядом факторов. Изменение потенциала мембраны не только стимулирует потенциал-активируемые каналы, но и модулирует работу других типов ионных каналов. Каналы регулируются химическими лигандами, которые могут связываться с каналами как с вне-, так и с внутриклеточной стороны мембраны. Инактивация некоторых потенциал-активируемых каналов требует входа ионов Ca^{2+} .

Ионы Ca^{2+} могут инактивировать канал либо непосредственно связываясь участком канала, либо активируя ферменты их инактивирования посредством белкового дефосфорилирования.

Каналы могут также регулироваться давлением или растяжением (механически). При этом энергия, связанная с растяжением мембраны, передается к каналу по цитоскелету или непосредственно, путем изменения натяжения липидного бислоя. Быстрые воротные механизмы каналов могут регулироваться долговременными изменениями метаболического состояния клетки. Некоторые каналы чувствительны к внутриклеточному уровню АТФ, тогда как у других воротные свойства изменяются в ответ на изменение окислительно-восстановительного состояния и внеклеточного pH. Ионные каналы являются мишенями действия целого ряда внутриклеточных посредников, которые образуются в результате активации каскадов внутриклеточных реакций: циклических нуклеотидов, протеинкиназ, газообразных посредников, арахидоновой кислоты, ее метаболитов и др. жирных кислот [11, 20, 25].

Экспериментальные методы исследования ионных каналов

Регистрация интегральных токов и потенциалов

Движение ионов через огромное количество различных ионных каналов мембраны формирует интегральный трансмембранный ток, который вызывает перераспределение заряда на мембране и изменения потенциала. При этом возможна либо регистрация изменений потенциала на мембране в результате протекания тока, либо регистрация тока. Электрофизиологические методы регистрации потенциала и тока, текущих через мембрану возбудимой клетки, можно условно разделить на внутри- и внеклеточные. Для этого обычно используются металлические электроды или стеклянные микропипетки (микроэлектроды) [6].

Фиксация потенциала

Для этих целей была впервые применена методика двухэлектродной фиксации потенциала. Разность потенциалов между электродом сравнения, помещенным в изотонический раствор хлорида натрия, и измерительным электродом подается на вход операционного усилителя, где сравнивается с командным потенциалом, задаваемым экспериментатором. В случае различия этих потенциалов через другой электрод происходит компенсирующая данную разность инъекция тока, которая измеряется амперметром. Данная величина будет равняться суммарной величине всех ионных токов через мембрану. Дальнейшее развитие этих идей привело к созданию основного на данный момент экспериментального метода изучения свойств ионных каналов — метода локальной фиксации потенциала (Patch clamp) [6, 18].

Метод локальной фиксации потенциала

Позволяет регистрировать амплитуду ионных токов одиночных каналов за счет образования гигаомного контакта между стеклянным электродом и клеточной стенкой. Таким образом, фрагмент мембраны, заключенный в микропипетке, оказывается изолированным от внешней среды, что уменьшает шумы снимаемого сигнала. Существуют следующие разновидности данного метода, в зависимости от которых подбирают необходимый электролитный состав в микропипетке.

Whole-cell. В пипетку подают давление таким образом, чтобы нарушить целостность изолированного сегмента мембраны. После этого состав цитоплазмы выравнивается с электролитным составом микропипетки.

Cell-attached. Данная конфигурация отличается только лишь возникновением гигаомного контакта с незначительной деформацией мембраны без явного нарушения целостности. Оба электрода находятся по одну сторону мембраны. Для задания трансмембранной разности потенциалов (внешний — пипеточный электрод) необхо-

можно использовать омывающие растворы, что создает сложности из-за многокомпонентности цитоплазматического состава.

Inside-out. Изолированный участок мембраны отрывают от клетки, и данную систему погружают в омывающий раствор, близкий по содержанию к цитоплазме. Тогда разность потенциалов на мембране строго равна разности потенциалов между электродами. Особенностью данной конфигурации является возможность регистрации единичного канала.

Inside-in. Осуществляется переходом от конфигурации Whole-cell медленным отведением микропипетки, за счет чего после разрыва неизоллированных участков мембрана смыкается в вывернутом виде. Как и при использовании Inside-out, метод позволяет исследовать одиночные каналы [6, 17, 18, 25].

Для расчета энергетических профилей ионов в каналах применяют комбинированный квантово-классический метод. Для этого используются: расчет энергетических профилей ионов (силовые поля молекулярной механики) и функциональных характеристик каналов (теория абсолютных скоростей реакций Эйринга), комбинированный квантово-классический метод, метод «энергетического выравнивания» третичных структур белков (построение хирально-модифицированных модельных каналов с измененной первичной структурой, структурно и функционально эквивалентных соответствующим природным каналам) [7].

Молекулярное моделирование работы ионных каналов

Данный метод способствует развитию более точного фармакологического воздействия на клетку, т.к. используется для дизайна новых препаратов, имеющих медицинское значение. Модель ионной проводимости позволяет целенаправленно подходить к созданию качественно новых лигандов, обеспечивающих неполный блок ионных каналов. Молекулярное моделирование заключается в поиске структурного шаблона канала, выравнивания его аминокислотных последовательностей и построении самой модели. В расчетах используется приближение атом-атомных потенциалов, учитывающая зависимости диэлектрической постоянной от расстояния [19].

Заключение

Ионные каналы клетки представляют собой сложные белковые структуры с молекулярными системами открытия, закрытия, селективности, инактивации и регуляции. Нарушения их активности могут привести к изменению функционирования клетки и всего организма в целом. Разработка новых методов исследования работы ионных каналов может быть использована для изучения действия лекарств и др. химических агентов на организм, а также для поиска новых эффективных фармакологических препаратов, в качестве активных центров которых служат рецепторы ионных каналов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Biel M., Schneider A., Wahl C. Cardiac HCN Channels: Structure, Function, and Modulation. *Trends Cardiovasc. Med.* 2002;5:206–212.
2. Boron W.F., Boulpaep E.L. *Medical physiology*. Elsevier Science (USA), 2003:1319.
3. Catterall W.A. Structure and regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2000;16:521–555.
4. Cowan W.M., Sudhof T.C., Stevens C.F. *Synapses*. The John Hopkins University Press: Baltimore and London, 2000:267.
5. da Silva R.R., Goroso D.G., Bers D.M., Puglisi J.L. A simulator to study ionic channel's stochastic behavior. *Comput. Biol. Med.* 2017;87:258–270.
6. Davis R.S., Sunil Kumar P., Sperotto M.M., Laradji M. Predictions of phaseseparation in three-component lipid membranes by the MARTINI force field. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2013;117:4072–4080.
7. Dmitriev A.V., Baryshnikov V.G., Markov I.V., Tverdislov V.A. Band and point statistical estimation of channel-forming polypeptides potential. *Progress in Chemometrics Research*. 2005;25:30–45.

8. Foskett J.K., White C., Cheung K.-H., Mak D.D. Inositol Trisphosphate Receptor Ca^{2+} Release Channels. *Physiol. Rev.* 2007;87:593–658.
9. Goldstein S.A.N., Bockenbauer D., O'Kelly I., Zilberberg N. Potassium leak channels and the KCNK family of two-P-domain subunits. *Nature Rev. Neurosci.* 2001;2:175–184.
10. Gururaja Rao S., Patel N., Singh H. Intracellular Chloride Channels: Novel Biomarkers in Diseases. *Front. Physiol.* 2020;11:96–102.
11. Hamill O., Martinac B. Molecular Basis of Mechanotransduction in Living Cells. *Physiol. Rev.* 2001;81:685–740.
12. Heuser J. Review of electron microscopic evidence favoring vesicle exocytosis as the structural basis of quantal release during synaptic transmission. *J. Exp. Physiol.* 1989;74:1051–1069.
13. Hille B. *Ionic channels of excitable membranes*. 3rd ed. Sunderland, MA: Sinauer, 2001:814.
14. Jeng C., Fu S., You C., Peng Y., Hsiao C., Chen T., et al. Defective Gating and Proteostasis of Human ClC-1 Chloride Channel: Molecular Pathophysiology of Myotonia Congenita. *Front. Neurol.* 2020;11:76–84.
15. Jentsch T.J., Stein V., Weinreich F., Zdebek A.A. Molecular Structure and Physiological Function of Chloride Channels. *Physiol. Rev.* 2002;82:503–568.
16. Jiang Y., Lee A., Chen J., et al. X-ray structure of a voltage-dependent Kv channel. *Nature.* 2003;6935:33–41.
17. Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M. *Principal of neural science*. The McGraw-Hill Companies, 2002:1321.
18. Klauda J.B., Venable R.M., Freites J.A., O'Connor J.W., Tobias D.J., et al. Update of the CHARMM all-atom additive force field for lipids: validation on six lipid types. *The Journal of Physical Chemistry B.* 2010;114:7830–7843.
19. Korkosh V.S., Zhorov B.S., Tikhonov D.B. Folding similarity of the outer pore region in prokaryotic and eukaryotic sodium channels revealed by docking of conotoxins GIIIA, PIHIA, and KIIIA in a NavAb-based model of Nav1.4. *J. Gen. Physiol.* 2014;144:231–244.
20. Liu Y., Chipot C., Shao X., Cai W. The effects of 7-dehydrocholesterol on the structural properties of membranes. *Physical Biology.* 2011;5:56–62.
21. Manville R.W., Abbott G.W. Potassium channels act as chemosensors for solute transporters. *Commun. Biol.* 2020;3:90–96.
22. Papp F., Hajdu P., Tajti G., Toth A., Nagy E., Fazekas Z., et al. Periodic Membrane Potential and Ca^{2+} Oscillations in T Cells Forming an Immune Synapse. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21:5–11.
23. Robledo-Avila F., Ruiz-Rosado J., Brockman K., Partida-Sánchez S. The TRPM2 Ion Channel Regulates Inflammatory Functions of Neutrophils During *Listeria monocytogenes* Infection. *Front. Immunol.* 2020;11:97–103.
24. Thompson A., Lummis S. The 5-HT₃ receptor as a therapeutic target. *Expert Opin. Ther. Targets.* 2007;4:527–540.
25. Weiger T.M., Hermann A., Levitan I.B. Modulation of calcium-activated potassium channels. *J. Comp. Physiol.* 2002;188:79–87.
26. Xiong Z., Pignataro G., Li M., Chang S., Simon R. Acid-sensing ion channels (ASICs) as pharmacological targets for neurodegenerative diseases. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2008;8(1):25–32.
27. Yuan D., Ma Z., Tuo B., Li T., Liu X. Physiological Significance of Ion Transporters and Channels in the Stomach and Pathophysiological Relevance in Gastric Cancer. *Evid. Based Complement Alternat. Med.* 2020;12:28–38.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Бонь Елизавета Игоревна*, к.б.н., УО «Гродненский государственный медицинский университет»;
e-mail: asphodela@list.ru

Elizaveta I. Bon*, Cand. Sci. (Biol.), Grodno State Medical University;
e-mail: asphodela@list.ru

Максимович Наталия Евгеньевна, д.м.н., проф., УО «Гродненский государственный медицинский университет»;
e-mail: mne@grsmu.by

Nataliya Ye. Maksimovich, Dr. Sci. (Med.), Prof., Grodno State Medical University;
e-mail: mne@grsmu.by

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

<https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-1-43-56>



ВЛИЯНИЕ НЕЙРОПЕПТИДОВ — ДЕЛЬТА-СОН-ИНДУЦИРУЮЩЕГО ПЕПТИДА, КИСПЕПТИНА-10 И РТ-141 — НА ПОЛОВОЕ ПОВЕДЕНИЕ САМЦОВ КРЫС

С.Н. Субботина*, М.А. Юдин, А.А. Парфёнова, А.А. Кряжевских, А.Б. Орлова

ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт
военной медицины» Минобороны России,
195043, Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул. Лесопарковая, 4

В работе проведена сравнительная оценка влияния нейропептидов — дельта-сон-индуцирующего пептида (ДСИП), кисспептина-10 и РТ-141 — на показатели копуляторного поведения самцов крыс с естественным уровнем половой активности. Однократное внутривбрюшинное введение ДСИП (1 мг/кг) способствует активации мотивационной и копуляторной составляющей полового поведения самцов крыс при парном взаимодействии с восприимчивой самкой. Нейропептид значительно увеличивает долю сексуально активных самцов, скорость спаривания, среднее число эякуляций, необходимое для достижения состояния «полового истощения», уменьшает длительность отдыха животных. Кисспептин-10 (1 мг/кг) способствует поддержанию высокого уровня возбуждения в середине (увеличение скорости спаривания в 6-й копулятивной серии) и конце полового цикла (увеличение доли сексуально активных самцов в 8–9-й копулятивных сериях). РТ-141 (0,13 мг/кг) оказывает стимулирующее влияние на половую активность самцов крыс только в начале и середине полового цикла. Короткий срок реализации стимулирующих эффектов ДСИП и РТ-141 обуславливает необходимость коррекции схем дозирования и кратности введения нейропептидов.

Ключевые слова: дельта-сон-индуцирующий пептид, кисспептин-10, бремеланотид, РТ-141, копуляторное поведение, половое истощение, пост-эякуляторный рефрактерный период

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Субботина С.Н., Юдин М.А., Парфёнова А.А., Кряжевских А.А., Орлова А.Б. Влияние нейропептидов — дельта-сон-индуцирующего пептида, кисспептина-10 и РТ-141 — на половое поведение самцов крыс. *Биомедицина*. 2021;17(1):43–56. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-1-43-56>

Поступила 02.06.2020

Принята после доработки 14.12.2020

Опубликована 10.03.2021

EFFECTS OF DELTA-SLEEP-INDUCING, KISSPEPTIN-10 AND PT-141 NEUROPEPTIDES ON SEXUAL BEHAVIOUR IN MALE RATS

Svetlana N. Subbotina*, Mikhail A. Yudin, Anastasiya A. Parfyonova,
Aleksy A. Kryazhevskikh, Anastasiya B. Orlova

State Research Testing Institute of Military Medicine of the Ministry of Defense of Russia
195043, Russian Federation, Saint Petersburg, Lesoparkovaya Street, 4

The work presents a comparative assessment of the effects of delta-sleep-inducing peptide (DSIP), kisspeptin-10 and PT-141 neuropeptides on the copulatory behaviour in male rats with natural sexual activity.

A single intraperitoneal injection of DSIP (1 mg/kg) promotes the motivational and copulatory components of sexual male rat behaviour in courtship of a receptive female. The neuropeptide application significantly boosts sexual activity in males, rises the copulation rate, mean number of ejaculations towards sexual exhaustion and reduces rest periods in animals. Kisspeptin-10 (1 mg/kg) promotes high arousal in the middle (increased copulation rate in copulatory series 6) and end of the courtship cycle (increased ratio of sexually active males in copulatory series 8–9). PT-141 (0.13 mg/kg) facilitates sexual activity in male rats only in the onset and middle of the courtship cycle. The transience of DSIP and PT-141 stimulating effect warrants adjustments in the neuropeptide dosage and application regimens.

Keywords: delta-sleep-inducing peptide, kisspeptin-10, bremelanotide, PT-141, copulatory behaviour, sexual exhaustion, post-ejaculatory refractory period

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

For citation: Subbotina S.N., Yudin M.A., Parfyonova A.A., Kryazhevskikh A.A., Orlova A.B. Effects of Delta-sleep-inducing, Kisspeptin-10 and pt-141 Neuropeptides on Sexual Behaviour in Male Rats. *Journal Biomed.* 2021;17(1):43–56. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-1-43-56>

Submitted 02.06.2020

Revised 14.12.2020

Published 10.03.2021

Введение

Социальная значимость проблемы сексуальных дисфункций и устойчивый рост количества различных нарушений половой активности актуализирует необходимость поиска новых средств фармакологической коррекции изменений в сексуальной сфере. Причинами подобных нарушений могут быть снижение общего тонуса организма, разнообразные психоэмоциональные и соматические расстройства [15]. Ведущая роль в патогенезе большинства заболеваний сексуальной сферы отводится нарушению функционирования нейромедиаторных и нейрогуморальных систем, которое может быть связано с изменениями процессов биосинтеза или метаболизма макромолекул и лигандов, нарушением процессов хранения, выброса или обратного захвата медиаторов, а также различными нарушениями гуморальной регуляции полового поведения. Для коррекции этих изменений могут использоваться вещества эндогенного происхождения, проявляющие как регуляторную активность в отношении ЦНС, так и обладающие широким спектром фармакологической активности — нейропептиды. Механизмы их действия включают регуляцию энергетического метаболизма,

нейротрофическое действие, модуляцию активности эндогенных факторов роста, нейропротекцию, взаимодействие с системами нейропептидов и нейромедиаторов, повышение стрессоустойчивости и работоспособности и др. [8].

В течение двух последних десятилетий накоплены данные по изучению влияния нейропептидов на половую функцию при различных патологических состояниях. На сегодняшний день установлена роль нейропептидов в регуляции функции репродуктивной системы [2, 24, 25]. Например, нейромодулятор kisspeptin является мощным стимулятором секреции гонадотропин-релизинг-гормона, трансинаптическим модулятором механизмов обратной связи половых стероидов, участвует в процессах полового созревания, наступления фертильности, родов и лактации, определяет работу яичников [20, 21]. Описаны особенности секреции kisspeptin при гипогонадотропном гипогонадизме, преждевременном половом развитии, гиперпролактинемической недостаточности яичников, синдроме поликистозных яичников, а также наружном генитальном эндометриозе [12]. В то же время данные о влиянии пептида на регуляцию половой

активности у лиц мужского пола практически отсутствуют. В исследовании [23] подтверждена роль кисспептина в восприятии экспериментально-индуцированных сексуальных стимулов у мужчин. Это может представлять определенные перспективы применения пептида в терапии психосексуальных расстройств.

С момента открытия регуляторного дельта-сон-индуцирующего пептида (ДСИП) накоплен значительный объем информации, доказывающий его физиологическую активность на различных моделях патологических состояний [1]. Доказаны нейропротекторные, антиоксидантные, мембраностабилизирующие свойства пептида, а также перспективность его использования для устранения стрессиндуцированных сдвигов в органах и тканях [4, 14]. Однако работ по оценке влияния ДСИП на половую функцию — весьма ограниченное количество, а содержащаяся в них информация носит противоречивый характер. В работе [2] показано негативное влияние нейропептида на способность самок неинбредных крыс к зачатию и вынашиванию потомства, темпы физического развития эмбрионов, процессы остеогенеза. В другой работе применение ДСИП способствовало устранению нарушений репродуктивной функции самок крыс, вызванных длительным приемом морфина [3]. Данных о влиянии ДСИП на половое поведение самцов крыс в зарубежной и отечественной литературе не встречается.

Стимулирующее влияние на половую функцию отмечено у синтетического пептидного аналога α -меланоцитстимулирующего гормона, агониста меланокортиновых рецепторов 3-го и 4-го типа — бремеланотида (РТ-141). Анализ литературных данных показал, что в большинстве экспериментальных исследований эффективность РТ-141 оценивалась на поведенческой модели спонтанной эрекции полового члена у крыс без внешних (соци-

альных) сексуальных стимулов. Так, в течение 30 мин после введения крысам РТ-141 в дозе 50 мг/кг (интраназально) у всех животных регистрировали увеличение среднего числа спонтанных эрекции [22]. Отмечено, что курсовое введение РТ-141 крысам и приматам приводит к более быстрому и дозозависимому увеличению эректильной активности [19]. Результаты двойного слепого плацебо-контролируемого клинического исследования подтвердили терапевтическую эффективность пептида у мужчин с легкой и умеренной степенью эректильной дисфункции [18]. Эффективность пептида была показана при лечении расстройства полового возбуждения у женщин [16], однако для достижения терапевтического эффекта требовалось курсовое в течение 12-ти недель введение пептида в дозах 1,25 и 1,75 мг. Получены положительные результаты при однократном интраназальном введении бремеланотида женщинам в дозе 20 мг [17].

Таким образом, накопленный на сегодняшний день объем данных о физиологической активности нейропептидов и возможных механизмах их действия позволяет рассматривать кисспептин-10, ДСИП, РТ-141 и др. аналоги агонистов меланокортиновых рецепторов в качестве перспективных средств лечения сексуальных дисфункций. Вместе с тем влияние указанных пептидов на организм с естественным уровнем половой активности остается малоизученным, отмечается недостаток данных о влиянии нейропептидов на поведение спаривания, в т.ч. при однократном введении, сохраняются противоречивые данные в отношении влияния ДСИП на половую функцию. Эти обстоятельства определили цель настоящего исследования.

Цель исследования — провести сравнительную оценку влияния нейропептидов — кисспептина-10, ДСИП и РТ-141 —

на показатели копуляторного поведения самцов крыс с естественным уровнем половой активности.

Материалы и методы

Исследовали эффекты кисспептина-10 (H-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂), ДСИП (H-Trp-Ala-Gly-Gly-Asp-Ala-Ser-Gly-Glu-OH) и PT-141 (Ac-Nle-cyclo [Asp-His-D-Phe-Arg-Trp-Lys]-OH) при однократном внутривенном введении в дозах 1 мг/кг и 0,13 мг/кг соответственно. Водные р-ры нейропептидов вводили самцам крыс опытных групп за 30 мин до тестирования из расчета 0,1 мл на 100 г массы животного. Животные контрольной группы получали воду для инъекций в аналогичном объеме.

Субстанции нейропептидов синтезировали твердофазным методом с использованием 2-хлортритилхлоридной (ёмкостью 1,55 ммоль/г) и Ринк-амидной (ёмкостью 0,71 ммоль/г) смол по Fmoc/t-Bu стратегии. При последовательном наращивании пептидной цепи в качестве конденсирующих агентов использовали 1-гидрокси-бензотриазол (HOBt) и N,N'-диизопропилкарбодиимид (DIC), а также реактивы фирмы «Iris Biotech» чистотой не менее 98%. В результате синтеза было получено лиофилизированные водорастворимые субстанции чистотой не менее 85%. Анализ содержания и чистоты нарботанных образцов проводили с использованием жидкостного хроматографа «Agilent Technologies 1260 Infinity» с градиентным насосом «1260 Quat Pump VL», вакуумным дегазатором, автосамплером «Agilent 1260 ALS», термостатом, диодно-матричным детектором «Agilent 1260 DAD VL», масспектрометрическим детектором «Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS». Хроматографическая колонка LiChrospher WP 300 RP-18, длиной 250 мм, внутренним диаметром 4,6 мм, с размером пор 5 мкм. Подвижная фаза: А — 0,1% трифторук-

сусной кислоты в деионизированной воде, В — 0,1% трифторуксусной кислоты, 15% деионизированной воды, 10% 2-пропанола в ацетонитриле. Режим элюирования (градиентный): 2,5% фазы В — с 0-й по 9-ю мин, 80% фазы В — с 20-й по 24-ю мин, 2,5% фазы В — с 25-й по 30-ю мин, скорость потока 0,8 мл/мин. Температура термостата колонки 40°C, объём ввода образца 20 мкл. УФ детектирование при длине волны 210 нм. Режим ионизации: электростатическое распыление при атмосферном давлении Dual ESI, Full MS (Positive). Обработку данных проводили с использованием программного обеспечения для сбора и обработки данных MassHunter Workstation.

Исследования выполнены на 48-ми белых беспородных крысах обоего пола массой 200–300 г, полученных из питомника «Рапполово» (Ленинградская обл.). Эксперименты проводили в соответствии с Правилами надлежащей лабораторной практики (Приказ Минздрава России № 199н от 01.04.2016 г.). 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-ти сут.

Тестирование животных осуществляли в лабораторных условиях при температуре 18–24°C, относительной влажности воздуха 40–80%. Исключали воздействие постороннего шума и прочих раздражителей, не допускали присутствия в лаборатории животных других видов. С целью формирования новых циркадных ритмов в течение 2-х недель до начала тестирования животных содержали в виварии с реверсивным светом и свободным доступом к воде и пище. Цикл освещенности помещения, где размещались экспериментальные животные, включал 2 фазы: темная фаза — с 10-ти ч до 22-х ч, светлая фаза — с 22-х ч до 10-ти ч. Опыты проводили в течение темной фазы суточного цикла при тусклом красном освещении.

Подготовку самок осуществляли путем овариоэктомии [5]. Для формирования эстрального цикла через 10 дней после операции самкам вводили подкожно масляный р-р β -эстрадиола («Sigma Aldrich», США) в дозе 50 мкг на крысу (первый день цикла), через 48 ч — масляный р-р прогестерона («Дальхимфарм», Россия) в дозе 500 мкг на крысу (третий день цикла). Рецептивность самок подтверждали вагинальным мазком и выраженностью лордоза. Через 7 сут после начала гормональной терапии (по завершению двух эстральных циклов), когда устанавливался регулярный половой цикл, приступали к тренировкам половой активности самок, которые заключались в подсадке на период 30 мин к самке с гормонально вызванным эструсом самца с предшествующим половым опытом. По итогам трех экспозиций для дальнейшего исследования было отобрано 24 самки с выраженной рецептивностью и отсутствием антагонистического поведения по отношению к самцу. Эксперименты проводили в третий день цикла спустя 4 ч после введения прогестерона.

Подготовка самцов крыс заключалась в последовательных в течение 2-х недель тренировках с целью формирования полового опыта. Тренировка состояла в подсадке к самцу рецептивной самки на период 15 мин (3 раза в неделю). Для дальнейших исследований отбирали самцов с высоким стабильным уровнем половой активности (1–2 эякуляции за период теста). Контрольную и опытные группы формировали из животных с близкими средними значениями показателей полового поведения, каждая экспериментальная группа включала 6 самцов крыс.

Оценку влияния нейропептидов на половое поведение проводили в тесте парного взаимодействия самца с самкой до достижения самцом состояния «полового истощения». Критериями достижения состояния «полового истощения» (или критериями за-

вершения полового цикла) считали: отсутствие активности у самца в течение 30-ти мин после последней эякуляции (критерий насыщения), отсутствие копуляции в течение 60-ти мин после предъявления рецептивной самки (критерий инертности) или отсутствие эякуляции при сохранении копулятивной активности более 60-ти мин (критерий несостоятельности) [1]. Тест отражает заверченный цикл полового поведения самца, состоящий из копулятивных серий (последовательность попыток садок и садок с интромиссиями, завершающихся садкой с эякуляцией) и пост-эякуляторных рефрактерных периодов и позволяет провести оценку активирующего или угнетающего действия фармакологических средств на фоне развивающегося в процессе спаривания утомления [11].

Регистрировали следующие показатели полового поведения самцов крыс: «латентный период первой садки с интромиссией» (мин); «количество интромиссий в каждой копулятивной серии» (ед.); «количество копулятивных серий» (ед.); «количество эякуляций» (ед.); «длительность копулятивной активности» (мин); «длительность пост-эякуляторных рефрактерных периодов» (мин). Рассчитывали показатели: «общее количество интромиссий» (ед.); «частота интромиссий» (скорость копуляции) (ед./мин); «общая длительность копулятивных серий» (мин).

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Statistica 10.0 и Excel 2010. Результаты представляли в виде медианы и процентилей [25;75]. В ходе проведения анализа использовали непараметрические методы статистики: для сравнения количественных показателей — критерий Краскела—Уоллиса, для качественных показателей — критерий χ^2 . Критическое значение уровня статистической значимости принимали равным 0,05. Долю животных представляли в виде количества животных с призна-

Таблица 1. Влияние нейропептидов на показатели копуляторного поведения самцов крыс
Table 1. Neuropeptide impact on copulatory behaviour in male rats

Показатель	Группы/нейропептид			
	Контроль	Кисспептин-10	ДСИП	РТ-141
Латентный период первой садки с интромиссией, мин	0,1 [0,1;0,1]	0,0 [0,0;0,1]	0,1 [0,0;0,2]	0,1 [0,0;0,1]
Общее количество интромиссий, ед.	60,0 [44,0;100,0]	103,0 [65,0;137,0]	82,0 [72,0;88,0]	78,0 [46,0;218,0]
Общая длительность копулятивных серий, мин	86,2 [34,5;105,6]	62,6 [29,0;114,3]	39,9 [26,8;44,0]	78,2 [29,9;100,6]
Скорость копуляции, интр./мин	1,2 [0,6;1,3]	1,9 [1,1;2,7]	2,2 [1,8;2,5]*	2,3 [1,0;2,7]
Количество копулятивных серий, ед.	7,0 [5,0;7,0]	9,0 [7,0;10,0]	10,0 [8,0;12,0]*	8,0 [6,0;8,0]
Количество эякуляций, ед.	7,0 [4,0;7,0]	8,0 [6,0;10,0]	10,0 [8,0;12,0]*	7,0 [6,0;8,0]

Примечание: * — отличия от контрольных значений статистически значимы при $p < 0,05$.

Note: * — statistical significance vs. control values, $p < 0.05$.

ком по отношению к общему количеству животных в группе.

Результаты исследований

В начале полового цикла поведение спаривания самцов крыс контрольной и опытных групп характеризовалось высоким естественным уровнем копулятивной активности. Об этом свидетельствовали высокая скорость инициации спаривания (латентный период первой садки с интромиссией во всех экспериментальных группах не превышал 0,1 мин) и отсутствие садок без интромиссий (табл. 1).

Введение нейропептидов сопровождалось статистически значимым усилением копулятивной активности самцов только в случае применения ДСИП. Несмотря на повышение общей скорости копуляции во всех опытных группах в 1,6–1,8 раза по сравнению с контролем, достоверный эффект был получен только при введении ДСИП. Так, в соответствии с данными табл. 1, ДСИП был эффективен по трем параметрам из шести: скорость копуляции, количество проведенных копулятивных серий и количество совершенных эякуляций значительно превышали аналогичные показатели контрольной группы (при $p < 0,05$). Остальные нейропептиды, несмотря на отличие значений указанных показателей

по сравнению с контролем, были неэффективны.

Уровень генитальной стимуляции, определяемый по общему количеству совершенных интромиссий, необходимых для достижения эякуляции, во всех опытных группах был сопоставим с контрольными значениями.

Анализ скорости копуляции в различные сроки полового цикла подтвердил активирующее действие нейропептидов. Нейропептиды ДСИП и РТ-141 значимо увеличивали скорость спаривания в начале и середине полового цикла. Введение кисспептина-10 сопровождалось достоверным увеличением показателя только при выполнении самцами 6-й копулятивной серии (табл. 2).

Позитивное фармакологическое действие нейропептидов проявлялось в отношении показателя «доля сексуально активных самцов». При введении ДСИП и кисспептина-10 большая часть самцов совершили 8 копулятивных серий и более, в то время как в группе контроля самцам для достижения состояния «полового истощения» требовалось выполнить не более 7-ми копулятивных серий. Максимальный прирост показателя регистрировали при применении ДСИП. В группе с введением нейропептида статистически значимое увеличение

Таблица 2. Влияние пептидов на скорость копуляции самцов крыс в завершённом половом цикле

Table 2. Peptide impact on completed courtship cycle copulation rate in male rats

Копуля- тивная серия	Контроль		Кисспептин- 10		ДСИП		РТ-141	
	Скорость копуляции, интр./мин	Доля жив-х	Скорость копуляции, интр./мин	Доля жив-х	Скорость копуляции, интр./мин	Доля жив-х	Скорость копуляции, интр./мин	Доля жив-х
1	1,7 [1,3;2,2]	6/6	3,1 [1,5;3,7]	6/6	4,3 [2,4;7,0]*	6/6	3,9 [3,1;6,0]*	6/6
2	1,5 [1,3;1,8]	6/6	3,4 [2,9;5,5]	6/6	2,8 [2,3;5,4]*	6/6	2,9 [2,3;5,0]*	6/6
3	1,6 [1,4;2,0]	6/6	3,5 [1,9;4,1]	6/6	4,0 [2,9;5,0]*	6/6	1,8 [1,2;2,3]	6/6
4	2,0 [1,6;2,1]	6/6	2,7 [1,7;3,6]	6/6	4,3 [2,8;5,3]*	6/6	4,3 [3,6;5,6]*	6/6
5	1,7 [1,5;2,0]	5/6	2,7 [1,2;5,0]	6/6	3,7 [3,0;4,3]*	6/6	2,9 [1,8;4,2]	6/6
6	1,3 [0,8;1,8]	4/6	3,2* [1,5;4,0]	6/6	2,8 [2,3;3,7]*	6/6	2,4 [1,6;2,8]	6/6
7	0,6 [0,2;1,2]	4/6	3,4 [1,8;4,3]	5/6	2,3 [1,4;3,4]*	6/6	1,5 [0,7;1,9]	4/6
8	—	0/6	2,2 [1,5;4,2]	4/6*	2,5 [0,7;3,0]	5/6*	0,6 [0,0;0,6]	3/6*
9	—	0/6	1,2 [0,3;1,8]	3/6*	1,3 [0,8;2,0]	4/6*	—	0/6
10	—	0/6	1,5 [1,0;1,9]	2/6	1,6 [1,2;2,2]	3/6*	—	0/6
11	—	0/6	0,9 [0,9;0,9]	1/6	2,0 [1,0;2,2]	3/6*	—	0/6
12	—	0/6	—	0/6	0,8 [0,1;1,5]	2/6	—	0/6

Примечание: * — отличия от контрольных значений статистически значимы при $p < 0,05$.

Note: * — statistical significance vs. control values, $p < 0.05$.

доли сексуально активных самцов отмечали с 8-й по 11-ю копулятивную серию. Напротив, введение бремеланотида вызывало кратковременное усиление половой активности самцов крыс: выполнение 9-й копулятивной серии в группе не отмечали.

Учитывая, что любое изменение характера полового поведения автоматически приводит к изменению сопряженных показателей, в т. ч. и относительных их величин, совместно с показателями «скорость копуляции» и «количество копулятивных серий», совершенных самцами до достижения состояния «полового истощения», проводили оценку длительности завершённого полового цикла. Установлено, что минимальные значения показателя соответствовали группе с введением ДСИП. Длительность завершённого полового цикла в опытной группе

составила 117,2 [102,0;132,8] мин против 135,7 [99,8;157,3] мин в группе контроля. На фоне введения нейропептидов претерпевал изменение показатель «суммарное время копулятивной активности» животных. Отмечали, что в группе с введением ДСИП длительность всех копулятивных серий не превышала 39,9 мин (36% от общей длительности полового цикла), в то время как в контроле этот показатель был более чем в 2 раза выше — 86,2 мин (61,4% от общей длительности полового цикла). Несмотря на то, что указанные изменения не носили статистически значимый характер, показано, что с одной стороны — введение ДСИП сопровождается усилением половой активности, проявляющимся в повышении значений показателей, отражающих состояние копуляторно-эякуляторного

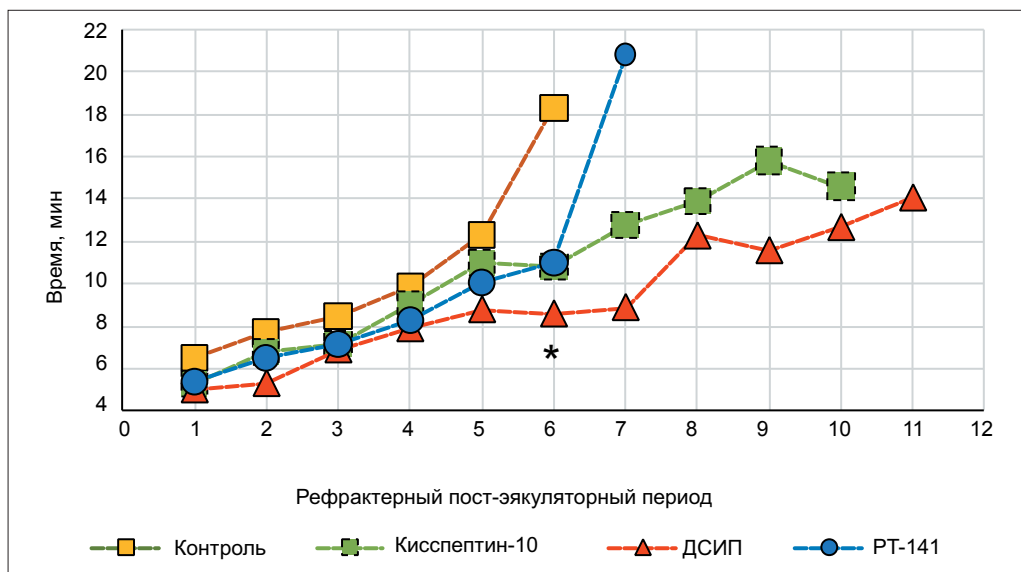


Рис. 1. Влияние нейропептидов на длительность пост-эякуляторного рефрактерного периода.

Примечание: * — значимые отличия от показателя животных контрольной группы, $p < 0,05$.

Fig. 1. Neuropeptide impact on post-ejaculatory refractory period duration.

Note: * — significant differences from the indicator of animals of the control group, $p < 0.05$.

механизма, а с другой стороны, для реализации максимальных эффектов и достижения состояния «полового истощения» животным требуется вдвое меньше времени в сравнении с контролем.

Длительность завершенного полового цикла у самцов, получавших кисспептин-10 и РТ-141, была сопоставима с контрольными значениями и составила 140,6 [121,5;175,3] мин и 132,4 [85,9;160,0] мин соответственно.

Для изучения влияния нейропептидов на уровень возбуждения животных был проведен сравнительный анализ длительности пост-эякуляторных рефрактерных периодов в течение завершенного полового цикла (рис. 1).

На кривых, характеризующих изменение длительности пост-эякуляторного рефрактерного периода, отмечали следующие особенности:

1) в начальной стадии полового цикла (до 5-го пост-эякуляторного рефрактерного периода) наблюдали плавный рост показателя

во всех экспериментальных группах. Применение нейропептидов не вызвало значимого сокращения времени отдыха самцов. Так, в группе контроля для возобновления копулятивной активности самцам требовалось в среднем 6,5–12,3 мин отдыха после 1–5-й копулятивной серии, в опытных группах — 5,0–10,1 мин соответственно;

2) в середине полового цикла регистрировали значимое снижение показателя в группе с введением ДСИП после выполнения самцами 6-й копулятивной серии. Время отдыха опытных самцов составило 8,6 [7,5;9,7] мин против 18,3 [16,6;21,8] мин в контроле (при $p < 0,05$);

3) в заключительной стадии полового цикла отсутствие контрольных данных не позволило выявить достоверного стимулирующего влияния нейропептидов на степень возбуждения животных. При применении ДСИП и кисспептина-10 отмечали дальнейшее плавное увеличение времени отдыха между копулятивными сериями,

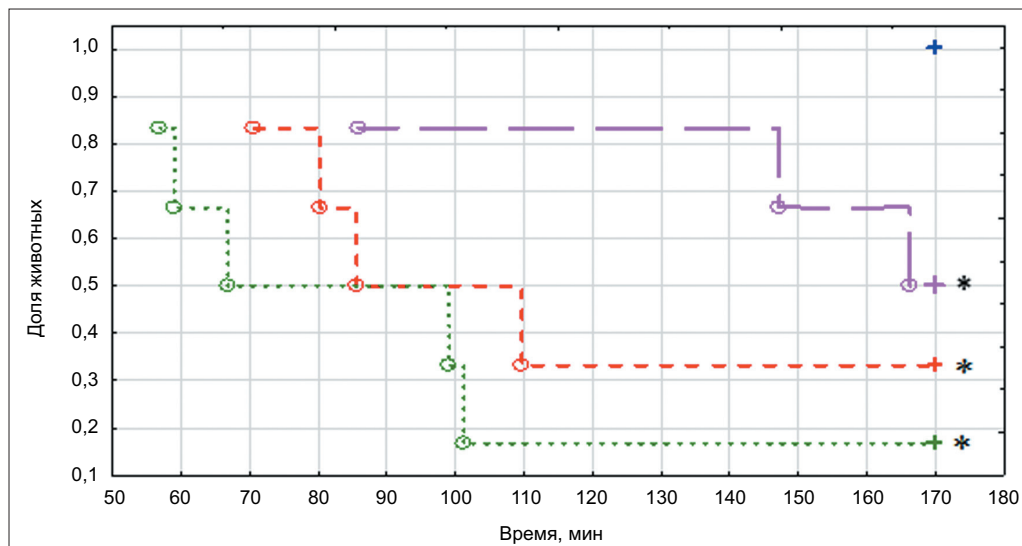


Рис. 2. Доля животных и латентный период эякуляций в 8-й копулятивной серии. Распределение длительностей латентных периодов эякуляций представлены в виде кривых Каплана—Майера.

Примечание: • — животные, закончившие копулятивную серию эякуляцией; + — обозначены животные без эякуляции; * — значимые отличия от показателя животных контрольных групп, $p < 0,05$; + — контроль; — — кисспептин-10; ····· — ДСИП; — — РТ-141.

Fig. 2. Proportion of animals and ejaculation latency time in copulatory series 8. Ejaculation latency time distributions are Kaplan—Mayer curves.

Note: • — ejaculation at end of copulatory series; + — no ejaculation; * — significance vs. control groups, $p < 0.05$; + — control; — — kisspeptin-10; ····· — DSIP; — — PT-141.

при этом длительность рефрактерных периодов не превышала 15,8 мин. Сохранение копулятивной активности вплоть до 11-й и 12-й копулятивных серий свидетельствовало о высоком уровне возбуждения и сохранении половой мотивации у самцов опытных групп.

Вместе с тем данные о распределении животных в контрольной и опытных группах по показателю «латентный период эякуляции» подтверждали стимулирующее влияние кисспептина-10 и ДСИП в заключительной стадии полового цикла (рис. 2).

Для большей наглядности на рисунке в качестве завершающей представлена 8-я копулятивная серия. Применение ДСИП и кисспептина-10 сопровождалось снижением латентного периода эякуляций и значимым увеличением доли эякулировавших животных (при $p < 0,05$). На фоне введения

РТ-141 сдвиги указанных параметров были менее выражены: латентные периоды эякуляции увеличивались, доля эякулировавших самцов составила 50 %.

Анализ завершающей копулятивной серии в половом цикле самцов крыс позволил выявить еще одну особенность действия нейропептидов. При введении кисспептина-10 и РТ-141 отмечали, что половина самцов в группе заканчивала половой цикл, достигая критерия несостоятельности. Это соответствовало характеру полового поведения контрольных животных. В то же время все самцы, получавшие ДСИП, заканчивали половой цикл, достигая критерия насыщения. Выявленная особенность могла свидетельствовать о подавлении половой мотивации (вследствие развившегося утомления у самцов) в конце полового цикла на фоне введения нейропептида.

Обсуждение результатов

Из трех исследуемых нейропептидов наиболее эффективным в отношении стимулирующего влияния на показатели копуляторного поведения самцов крыс с естественным уровнем половой активности оказался ДСИП. Несмотря на то, что в большинстве работ ДСИП рассматривается как нейропептид стресс-лимитирующего действия [13], способный к подавлению реакций мозговых структур на восприятие внешних сенсорных стимулов [6], оказывающий релаксирующий и седативный эффекты [10], полученные в наших исследованиях данные свидетельствуют об активации механизмов регуляции полового поведения самцов. Стимулирующие эффекты ДСИП отмечали на протяжении всего полового цикла. Для опытной группы были характерны высокие показатели половой мотивации, степени возбуждения и копулятивной активности (скорость копуляции, снижение длительности отдыха, количество проведенных копулятивных серий, закончившихся эякуляцией, доля сексуально активных животных значимо превышали аналогичные показатели контрольной группы). При этом суммарное время активности не превышало 36% от общей длительности заверщенного полового цикла. Полученные результаты позволяют предположить, что ДСИП-индуцированная активация центральных механизмов регуляции половой функции характеризуется мощным стимулирующим потенциалом. Вместе с тем энергоемкость процесса спаривания, усиленная введением ДСИП, обуславливает краткосрочную реализацию стимулирующих эффектов с последующим полным угнетением половой мотивации в завершающей стадии цикла (все самцы заканчивали половой цикл, достигая критерия насыщения). В основе краткосрочности эффектов может лежать крайняя лабильность молекулы ДСИП и быстрое ее разрушение при введении извне, подтвер-

ждением чему служат биохимические исследования *in vivo* и *in vitro* [9]. Кроме того, в работе [7] указывается, что важное место в реализации эффектов ДСИП отводится генетико-типологическим особенностям животных и длительности курса его назначения. Возможно, изменение схемы дозирования будет способствовать повышению резистентности организма к выполнению физических нагрузок, в т.ч. процессов, связанных с репродуктивной деятельностью животных.

Менее выраженные эффекты были получены при изучении влияния кисспептина-10 на половое поведение самцов крыс. Позитивное фармакологическое действие нейропептида проявлялось в отношении показателей «скорость спаривания» в 6-й копулятивной серии, а также «латентный период эякуляции» и «доля животных» (сексуально активные самцы в заключительной стадии полового цикла в 8–9-й копулятивных сериях). Результаты свидетельствовали, что введение нейропептида позволяет поддерживать высокий уровень возбуждения в процессе всего полового цикла, в т.ч. и на завершающих его стадиях, когда вследствие ингибирующего действия предшествующих эякуляций активность животных снижена. Сохраняющаяся половая мотивация (у половины самцов группы отмечали сохранение копулятивной активности на протяжении 60-ти мин после начала завершающей копулятивной серии в отсутствие эякуляции — критерий несостоятельности) подтверждала активирующее действие нейропептида на механизмы регуляции полового поведения самцов крыс.

Отчетливое фармакологическое действие РТ-141 отмечали только в начале и в середине полового цикла по статистически значимому изменению параметров спаривания — увеличение скорости копуляции и увеличение количества сексуально активных животных. В то же время указанный нейропептид не оказывал влияния на про-

лонгацию половой активности самцов. Для достижения «полового истощения» самцам крыс требовалось совершить не более 8-ми копулятивных серий. Очевидно, что проведение дальнейших исследований с целью уточнения дозового диапазона и спектра эффективности РТ-141 позволит обозначить перспективы применения препарата в качестве средства лечения сексуальных дисфункций.

Обобщая полученные данные, необходимо отметить, что использование теста парного взаимодействия самца с самкой до достижения самцом состояния «полового истощения» не позволило оценить степень влияния изученных нейропептидов на мотивационный компонент полового поведения самцов крыс в начале полового цикла. Высокую скорость инициации спаривания и отсутствие садок без интромиссий регистрировали у животных всех экспериментальных групп, включая контрольных. Это могло объясняться высоким уровнем половой активности и предшествующим половым опытом самцов. Для корректной оценки влияния нейропептидов на мотивационный компонент полового поведения целесообразно использование моделей, изучающих процептивное поведение животных, — поведенческие реакции, побуждающие партнера спариваться.

Малоинформативным в отношении оценки влияния нейропептидов на степень возбуждения животных оказался и показатель «общее количество интромиссий». Полученные значения в опытных группах были выше, но статистически значимых различий с контролем не отмечали. Известно, что продолжительная генитальная стимуляция (большое количество интромиссий) свидетельствует о развитии утомления и, как следствие, снижении уровня возбуждения. В то же время высокие значения показателя в нашем исследовании были обусловлены, в первую очередь, увеличением количества совершенных самцами копуля-

тивных серий. Анализ динамики показателей «скорость копуляции» и «длительность пост-эякуляторных рефрактерных периодов» в ряде случаев подтвердил активирующее действие нейропептидов на степень возбуждения самцов крыс.

Закключение

Изменение параметров поведения спаривания самцов крыс после однократного внутривбрюшинного введения ДСИП, кисспептина-10 и РТ-141 свидетельствует о стимулирующем действии нейропептидов на мотивационный и копуляторный компонент полового поведения. Наиболее выраженные позитивные эффекты отмечаются при применении ДСИП. Нейропептид значимо увеличивал долю сексуально активных самцов, скорость спаривания и среднее число эякуляций, необходимое для достижения состояния полового «истощения». Короткие латентные периоды эякуляций в завершающей стадии полового цикла, когда активность животных снижена, свидетельствовали о сохранении высокого уровня возбуждения самцов. В то же время краткосрочность реализации стимулирующих эффектов при применении ДСИП обуславливает необходимость коррекции схем дозирования и кратности введения нейропептида. Однократное введение РТ-141 способствует усилению половой активности самцов только в начале и середине полового цикла. Введение кисспептина-10 позволяет поддерживать высокий уровень возбуждения и половую мотивацию самцов в середине и конце полового цикла. В то же время результаты сравнительной оценки показателей копуляторного поведения — «количество проведенных копулятивных серий» и «количество эякуляций» — в течение заверщенного полового цикла не позволили получить статистически достоверный стимулирующий эффект соединения. Необходимо проведение дальнейших исследований по изуче-

нию роли пептидов в регуляции полового поведения и уточнения схем дозирования. Несомненный интерес представляет изучение влияния пептидных препаратов на половую функцию крыс при интраназальном

пути введения. Вместе с тем полученные результаты открывают перспективы применения нейропептидов в качестве средств коррекции сексуальных дисфункций у человека.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Белозерцева И.В. Экспериментальная фармакология полового поведения. В кн.: *Фармакология поведения*. СПб.: Издательство СПбГМУ. 2013:105–137. [Belozertseva I.V. Eksperimental'naya farmakologiya polovogo povedeniya [Experimental pharmacology of sexual behavior]. V kn.: *Farmakologiya povedeniya* [In the book: *Pharmacology of behavior*]. SPb: Izd-vo SPbGMU. 2013:105–137. (In Russian)].
2. Белых А.Е., Бобынцев И.И. Дельта-сон индуцирующий пептид: отдельные биологические эффекты и механизмы их развития. *Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье»*. 2016;1:79–90. [Belykh A.E., Bobyntseva I.I. Del'ta-son indutsiruyushchiy peptid: ot del'nyye biologicheskiye efekty i mekhanizmy ikh razvitiya [Delta-sleep inducing peptide: individual biological effects and mechanisms of their development]. *Kurskiy nauchno-prakticheskiy vestnik «Chelovek i yego zdorov'ye»* [Kursk Scientific and Practical bulletin "Man and his health"]. 2016;1:79–90. (In Russian)].
3. Белякова Н.А., Бонитенко Е.Ю., Носов А.В., Генералова К.Р., Лисицкий Д.С. Влияние нейропептидов на репродуктивную функцию самок неинбредных крыс. *Биомедицинский журнал Medline.ru*. 2019;20(1):1–16. [Belyakova N.A., Bonitenko E.Yu., Nosov A.V. Generalova K.R., Lisitskiy D.S. Vliyanie neuropeptidov na reproduktivnyu funktsiyu samok neinbrednykh krys [The effect of neuropeptides on the reproductive function of female non-inbred rats]. *Biomeditsinskiy zhurnal Medline.ru* [Biomedical journal Medline.ru]. 2019;20(1):1–16. (In Russian)].
4. Белякова Н.А., Бонитенко Е.Ю., Носов А.В., Бонитенко К.Е. Коррекция пептидными препаратами нарушений репродуктивной функции самок крыс, вызванных длительным применением морфина. *Биомедицинский журнал Medline.ru*. 2019;20(9):81–93. [Belyakova N.A., Bonitenko E.Yu., Nosov A.V., Bonitenko K.E. Korrektsiya peptidnymi preparatami narusheniy reproduktivnoy funktsii samok krys, vyzvannykh dlitel'nym primeneniym morfina [Correction by peptide drugs of reproductive dysfunction of female rats caused by prolonged use of morphine]. *Biomeditsinskiy zhurnal Medline.ru* [Biomedical journal Medline.ru]. 2019;20(9):81–93. (In Russian)].
5. Бондаренко Т.И., Шустанова Т.А. Молекулярные эффекты дельта-сон-индуцирующего пептида в регуляции гомеостаза при стрессе. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2010;8(12):45–63. [Bondarenko T.I., Shustanova T.A. Molekulyarnyye efekty del'ta-son-indutsiruyushchego peptida v regulatsii gomeostaza pri stresse [Molecular effects of delta-sleep-inducing peptide in the regulation of homeostasis under stress]. *Voprosy biologicheskoy, meditsinskoj i farmatsevticheskoy khimii* [Questions of biological, medical and pharmaceutical chemistry]. 2010;8(12):45–63. (In Russian)].
6. Буреш Я., Бурешева О., Хьюстон Дж. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. М.: Высшая школа. 1991:210. [Buresh Ya., Buresheva O., Kh'yuston Dzh. Metodiki i osnovnyye eksperimenty po izucheniyu mozga i povedeniya [Methods and basic experiments on the study of the brain and behavior]. Moscow: Vysshaya shkola Publ. 1991:210. (In Russian)].
7. Доведова Е.Л., Хрусталева Д.А. Активность ферментов обмена некоторых биогенных аминов в структурах мозга крыс линии Август при действии пептида дельта-сна. *Нейрохимия*. 2005;1:44–48. [Dovedova E.L., Khrustaleva D.A. Aktivnost' fermentov obmena nekotorykh biogennykh aminov v strukturakh mozga krys linii Avgust pri deystvii peptida del'ta-sna [The activity of metabolic enzymes of some biogenic amines in the brain structures of August rats under the action of the delta-sleep peptide]. *Neyrokhimiya* [Neurochemistry]. 2005;1:44–48. (In Russian)].
8. Доведова Е.Л., Хрусталева Д.А., Ещенко Н.Д. Эффекты ДСИП на фоне дисфункции моноаминергических систем в структурах мозга крыс линий Вистар и Август. *Вестник СПб. Университета*. 2007;3:75–79. [Dovedova E.L., Khrustaleva D.A., Yeshchenko N.D. Effekty DSIP na fone disfunktsii monoaminergicheskikh sistem v strukturakh mozga krys linii Vistar i Avgust [The effects of DSIP against the background of dysfunction of monoaminergic systems in the brain structures of Wistar and August rats]. *Vestnik SPb. Universiteta* [Vestnik St. Petersburg University]. 2007;3:75–79. (In Russian)].
9. Канунникова Н.П. Нейропротекторные свойства нейропептидов. *Журнал Гродненского государственного медицинского университета*. 2017;15(5):492–498. [Kanunnikova N.P. Neyroprotektornyye svoystva neuropeptidov [Neuroprotective properties of neuropeptides]. *Zhurnal*

- Grodenskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta [Journal of Grodno State Medical University]. 2017;15(5):492–498. (In Russian)].
10. Ковальзон В.М., Стрекалова Т.В. Дельта-сон индуцирующий пептид — тридцать лет спустя. *Нейрохимия*. 2006;23(4):276–282. [Koval'zon V.M., Strekalova T.V. Del'ta-son indutsiruyushchiy peptid — tridsat' let spustya [Delta-sleep inducing peptide thirty years later]. *Neyrokhiimiya [Neurochemistry]*. 2006;23(4):276–282. (In Russian)]
 11. Попова Н.С., Доведова Е.Л. Амфетаминовая функция дофаминергической системы и пептиды дельта-сна. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 1998;1–2:24–29. [Popova N.S., Dovedova E.L. Amfetaminovaya funktsiya dofaminer-gicheskoy sistemy i peptidy del'ta-sna [Amphetamine function of the dopaminergic system and peptides of delta sleep]. *Rossiyskiy fiziologicheskiy zhurnal im. I.M. Sechenov [Russian Physiological Journal named after I.M. Sechenov]*. 1998;1–2:24–29. (In Russian)].
 12. Субботина С.Н., Парфёнова А.А., Юдин М.А., Быкова А.Ф. Сравнительный анализ информативности методов оценки полового поведения самцов крыс. *Журнал высшей нервной деятельности*. 2020;70(2):277–288. [Subbotina S.N., Parfenova A.A., Yudin M.A., Bykova A.F. Sravnitel'nyy analiz informativnosti metodov otsenki polovogo povedeniya samtsov krys [Comparative analysis of the information content of methods for assessing the sexual behavior of male rats]. *Zhurnal vysshey nervnoy deyatel'nosti [J. of Higher Nervous Activity]*. 2020;70(2):277–288. (In Russian)].
 13. Ярмолинская М.И., Ганбарли Н.Ф., Айламазян Э.К. Значение кисспептина в регуляции функции репродуктивной системы. *Журнал акушерства и женских болезней*. 2016;LXV(6):4–18. [Yarmolinskaya M.I., Ganbarli N.F., Aylamazyan E.K. Znachenie kisspeptina v regulyatsii funktsii reproduktivnoy sistemy [The value of kisspeptin in the regulation of the reproductive system]. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh bolezney [J. of Obstetrics and Women's Diseases]*. 2016;LXV(6):4–18. (In Russian)].
 14. Bogolepov N.N., Popova E.N., Koplik E.V., et al. Structural-functional organization of neurons in the cerebral cortex of rats with different levels of resistance to delta sleep-inducing peptide. *Neurosci. Behav. Physiol.* 2004;34(6):611–616.
 15. Bondarenko T.I., Sorokina I.A., Mayboroda E.A., et al. Effect of delta sleep-inducing peptide on oxidative modification of proteins in rat tissues and blood during physiological aging. *Bull. Exp. Biol. and Med.* 2012;153(3):371–374.
 16. Calabro R.S., Caccialo A., Bruschetta D., et al. Neuroanatomy and function of human sexual behavior: A neglected of unknown issue? *Brain and Behavior*. 2019;9(12):e01389.
 17. Clayton A.H., Althof S.E., Kingsberg S., et al. Bremelanotide for female sexual dysfunctions in premenopausal women: a randomized, placebo-controlled dose-finding trial. *Womens health*. 2016;12(3):325–337.
 18. Diamond L.E., Earle D.C., Heiman J.R., et al. Original research — women's sexual health: an effect on the subjective sexual response in premenopausal women with sexual arousal disorder by bremelanotide (PT-141), a melanocortin receptor agonist. *J. of sexual medicine*. 2006;3(4):628–638.
 19. Diamond L.E., Earle D.C., Rosen R.C., et al. Double-blind, placebo-controlled evaluation of the safety, pharmacokinetic properties and pharmacodynamic effects of intranasal PT-141, a melanocortin receptor agonist, in healthy males and patients with mild-to-moderate erectile dysfunction. *Int. J. of Impotence Research*. 2004;16:51–59.
 20. Molinoff P.B., Shadiak A.M., Earle D.C., Diamond L.E. PT-141: Melanocortin agonist for the treatment of sexual dysfunction. *Ann. N.-Y. Acad. Sci.* 2003;994:96–102.
 21. Nejad S.Z., Tehrani F.R., Vakili A.Z. The role of kisspeptin in Female Reproduction. *Int. J. of Endocrinology and Metabolism*. 2017;15(3):1–11.
 22. Pielecka-Fortuna J., Chu Z., Moenter S. Kisspeptin acts directly and indirectly to increase Gonadotropin-Releasing hormone neuron activity and its effects are modulated by estradiol. *Endocrinology*. 2008;149(4):1979–1986.
 23. Shadiack A.M., Sharma S.D., Earle D.C., Spana C., Hallam T.J. Melanocortins in the treatment of male and female sexual dysfunction. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2007;7:1137–1144.
 24. Yang L., Demetriou L., Wall M.B., et al. Kisspeptin enhances brain responses to olfactory and visual cues of attraction in men. *JCI Insight*. 2020;5(3):e133633.
 25. Young S.A. “kiss” before conception: triggering ovulation with kisspeptin-54 may improve IVF. *J. of Clinical Investigation*. 2014;124(8):3277.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Субботина Светлана Николаевна*, к.б.н.,
ФГБУ «Государственный научно-исследователь-
ский испытательный институт военной медици-
ны» Минобороны России;
e-mail: gniiym_15@mil.ru

Svetlana N. Subbotina*, Cand. Sci. (Biol.), State
Research Testing Institute of Military Medicine of
the Ministry of Defense of Russia;
e-mail: gniiym_15@mil.ru

Юдин Михаил Анатольевич, д.м.н., доц.,
ФГБУ «Государственный научно-исследователь-
ский испытательный институт военной медици-
ны» Минобороны России;
e-mail: gniiivm_15@mil.ru

Парфёнова Анастасия Альбертовна, ФГБУ
«Государственный научно-исследовательский
испытательный институт военной медицины»
Минобороны России;
e-mail: gniiivm_15@mil.ru

Кряжевских Алексей Александрович, ФГБУ
«Государственный научно-исследовательский
испытательный институт военной медицины»
Минобороны России;
e-mail: gniiivm_15@mil.ru

Орлова Анастасия Борисовна, ФГБУ «Государ-
ственный научно-исследовательский испытатель-
ный институт военной медицины» Минобороны
России;
e-mail: gniiivm_15@mil.ru

Mikhail A. Yudin, Dr. Sci. (Med.), Assoc. Prof.,
State Research Testing Institute of Military
Medicine of the Ministry of Defense of Russia;
e-mail: gniiivm_15@mil.ru

Anastasiya A. Parfyonova, State Research Testing
Institute of Military Medicine of the Ministry of
Defense of Russia;
e-mail: gniiivm_15@mil.ru

Aleksey A. Kryazhevskikh, State Research Testing
Institute of Military Medicine of the Ministry of
Defense of Russia;
e-mail: gniiivm_15@mil.ru

Anastasiya B. Orlova, State Research Testing
Institute of Military Medicine of the Ministry of
Defense of Russia;
e-mail: gniiivm_15@mil.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ КОРРЕКЦИЯ ПЕРЕНОСИМОСТИ ОДНОВРЕМЕННОГО ГИПОКСИЧЕСКОГО И ТЕМПЕРАТУРНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ОРГАНИЗМА

Е.Б. Шустов^{1,4,*}, Ю.В. Фокин², С.Л. Люблинский², О.В. Алимкина², А.Е. Ким³,
Д.Ю. Ивкин⁴, Е.Л. Матвеевко², А.С. Ивкина⁴, Г.А. Плиско⁴, М.А. Поверьева⁴

¹ ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии им. акад. С.Н. Голикова ФМБА России»
192019, Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, 1

² ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»
143442, Российская Федерация, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, влд. 1

³ ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Минобороны России
194044, Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул. Лебедева, 6

⁴ ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Минздрава России
197376, Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 14

Экспериментальной моделью исследования была оценка функционального состояния лабораторных животных (критерий — способность выполнять физическую нагрузку в тесте вынужденного плавания) при одновременном воздействии гемической гипоксии и теплового фактора — гипертермии или гипотермии. Показано, что эффективным средством фармакологической коррекции переносимости комплексного воздействия гипоксии и гипертермии может быть препарат триметазидин, который проявил на двухфакторной модели выраженную антигипоксическую активность в отношении гемической гипоксии и комплексного воздействия гипоксии и гипертермии. В условиях одновременного влияния гемической гипоксии и гипотермии по выраженности корректирующего эффекта исследуемые препараты могут быть объединены в три группы: со слабым защитным действием (150–200% к уровню контроля — Фламенко, 250 мг/кг; триметазидин), с умеренным защитным действием (200–300% к уровню контроля — полипептидный комплекс; Фламенко, 50 и 75 мг/кг; Гипоксен) и более высоким уровнем эффекта (более 300% — курсовое введение специализированного продукта спортивного питания «МيوАктив Спорт»).

Ключевые слова: биомоделирование, гипертермия, гипоксия, гипотермия, лабораторные животные, комбинированное воздействие, работоспособность, фармакологическая коррекция

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Шустов Е.Б., Фокин Ю.В., Люблинский С.Л., Алимкина О.В., Ким А.Е., Ивкин Д.Ю., Матвеевко Е.Л., Ивкина А.С., Плиско Г.А., Поверьева М.А. Фармакологическая коррекция переносимости одновременного гипоксического и температурного воздействия на функциональное состояние организма. *Биомедицина*. 2021;17(1):57–69. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-1-57-69>

Поступила 09.11.2020

Принята после доработки 14.12.2020

Опубликована 10.03.2021

DRUG CORRECTION OF HYPOXIC THERMAL IMPACT ON ORGANISMAL FUNCTIONAL STATE

Evgeny B. Shustov^{1,4,*}, Yuriy V. Fokin², Stanislav L. Lyublinskiy², Oksana V. Alimkina²,
Aleksey E. Kim³, Dmitry Yu. Ivkin⁴, Elena L. Matveyenko², Arina S. Ivkina⁴,
Grigory A. Plisko⁴, Marina A. Poveryaeva⁴

¹ S.N. Golikov Research and Clinical Centre for Toxicology
of the Federal Medical and Biological Agency of Russia
192019, Russian Federation, Saint Petersburg, Behtereva Street, 1

² Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia
143442, Russian Federation, Moscow Region, Krasnogorsk District, Svetlye Gory Village, building 1

³ Military Medical Academy named after S.M. Kirov of the Ministry of Defense of Russia
194044, Russian Federation, Saint Petersburg, Lebedeva Street, 6

⁴ Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health care of Russia
197376, Russian Federation, Saint Petersburg, Professor Popov Street, 14

The study experimentally modelled the functional state in laboratory animals under haemic hypoxia combined with thermal exposure (hyper- or hypothermia) by estimating their physical capacity with the forced swim test. Trimetazidine has been proved an effective drug agent for the correction of hypoxic hyperthermal response in a two-factor model due to its marked antihypoxic effect observed under haemic hypoxia and hypoxia combined with hyperthermia. Relative to haemic hypoxia and hypothermia, the drugs studied can be separated between three groups by corrective efficiency: weak protectors (150–200% of control level, Flamenco 250 mg/kg, trimetazidine), moderate protectors (200–300%, polypeptide mix, Flamenco 50 and 75 mg/kg, Hypoxen) and effective protectors (>300%, course intake of specialised “MioActive Sport” nutrition additive).

Keywords: biomodelling, hyperthermia, hypoxia, hypothermia, laboratory animals, combined effects, physical capacity, drug correction

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

For citation: Shustov E.B., Fokin Yu.V., Lyublinskiy S.L., Alimkina O.V., Kim A.E., Ivkin D.Yu., Matveyenko E.L., Ivkina A.S., Plizko G.A., Poveryaeva M.A. Drug Correction of Hypoxic Thermal Impact on Organismal Functional State. *Journal Biomed.* 2021;17(1):57–69. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-1-57-69>

Submitted 09.11.2020

Revised 14.12.2020

Published 10.03.2021

Введение

Деятельность современного человека осуществляется в условиях возрастания экстремальности общей и профессиональной экологической среды, когда организм нередко подвергается воздействиям крайних колебаний барометрического давления, предельных температурных нагрузок и изменений газового состава вдыхаемого воздуха, интенсивных шумов и вибрации, негативных информационно-семантических и др. чрезвычайных факторов.

Коррекция переносимости отдельных экстремальных воздействий зависит от вида и дозы (интенсивности, длительности) действующего экстремального фактора и наличия у человека тех или иных проявлений (заболеваний, состояний), которые могут снижать резистентность к воздействию. Она реализуется путем применения представителей таких классов фармакологических средств, как антигипоксанты, антиоксиданты, цитопротекторы, ноотропы, психоэнергизаторы, актопротекторы,

глюкокортикоиды системного действия, стресспротекторы, психомоторные стимуляторы, адаптогены и др. метаболические корректоры. В практике профессиональной деятельности многих специальностей отмечаются ситуации комплексного воздействия экстремальных факторов физической природы, к числу которых относятся гипоксия, высокие или низкие температуры. Так, в условиях горно-пустынной местности типичным будет комплексное воздействие факторов гипертермии и умеренной гипоксии: полярники в Антарктиде на горной станции «Восток» встречаются с одновременным воздействием гипотермии и умеренной гипоксии. Комплексное воздействие высотной гипоксии и низких температур отмечается у альпинистов и военнослужащих горных подразделений, действующих на высотах более 3,5 км над уровнем моря, при разгерметизации кабин самолетов и дирижаблей в полете. Спасатели, работающие в очаге стихийных бедствий и техногенных катастроф в изолирующем снаряжении, подвергаются не только воздействию эндогенной гипертермии и действию измененной газовой среды, но и гипоксии физической нагрузки. Комплексное воздействие гипертермии, гипоксии, гиперкапнии будет отмечаться в очагах пожаров, в т. ч. при пожарах в гермообъектах (надводных, подводных и подземных объектах).

Необходимо отметить, что совместное воздействие на организм двух и более одновременно протекающих патологических процессов, имеющих общие регуляторные или метаболические звенья патогенеза, приводит к формированию синдрома взаимного тяжения (коморбидности) имеющейся симптоматики [10], как правило, замыкающейся на наиболее универсальные, типовые патологические процессы, к которым относятся, в первую очередь, механизмы генерации АТФ. Однако для таких ситуаций эффективная фармакологическая коррекция не разработана, что и послужило

обоснованием актуальности настоящей работы. В связи с этим **целью** исследования являлось обоснование выбора и сравнительный анализ эффективности обладающих протекторной активностью фармакологических средств, при одновременном действии двух экстремальных факторов — гипоксического и температурного.

Материалы и методы

Исследование проводилось на белых беспородных мышах-самцах массой 18–21 г, полученных из филиала «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России и прошедших 14-дневный карантин. Содержание и обращение с животными в эксперименте соответствовали требованиям приказа Минздрава России от 01.04.2016 г. № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики»; правилам, принятым Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей [12]; утвержденному письменному протоколу, в соответствии со Стандартными операционными процедурами исследователя (СОП); санитарным правилам по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев). Протокол эксперимента был одобрен биоэтической комиссией ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Животные содержались в вентилируемых клетках при температуре воздуха 20–22 °С, относительной влажности 40–60%, световом режиме 12:12 с включением света в 8⁰⁰. Использовался полнорационный корм ПК-120 (ООО «Лабораторкорм», Россия) при свободном доступе к водопроводной питьевой воде.

Исследования в условиях одновременного воздействия на организм двух неблагоприятных факторов проводятся по схеме двухфакторного дисперсионного анализа, позволяющего количественно определить значимость каждого фактора по отдельно-

сти, их взаимодействия и неконтролируемых факторов [6]. В качестве интегрального показателя функционального состояния и переносимости экстремального воздействия нами была выбрана способность животных выполнять физические нагрузки. Эффективность средств фармакологической коррекции оценивалась по динамике показателя физической работоспособности — времени плавания животных с грузом в 5% от массы тела в воде заданной температуры [1]. При моделировании воздействия температурного фактора были использованы следующие характеристики предварительно десатурированной воды, в которой плавали животные: для термокомфортных (термонеutralных) условий — 22–24°C, для условий гипертермии — 39–41°C, для условий гипотермии — 9–12°C [3, 16]. Умеренная интенсивность гипоксического воздействия обеспечивалась внутрибрюшинным введением метгемоглобинообразователя нитрита натрия в дозе 50 мг/кг [2]. Выполнение плавательной нагрузки осуществлялось через 30 мин после введения нитрита натрия.

Выбор средств профилактической коррекции переносимости экстремальных воздействий при комплексном воздействии гипоксического и температурного фактора был обусловлен механизмом формирования развивающегося при этом феномена взаимного отягощения. В основе этого феномена лежит нарушение генерации АТФ в процессе фосфорилирующего митохондриального окисления, истощение резервов регуляторных систем, дефицит субстратов и кофакторов энергетического и пластического обменов, которые являются общим звеном патогенеза различных экстремальных состояний [5, 17, 18]. В связи с этим, на основе вероятных механизмов формирования синдрома взаимного отягощения и известных свойств препаратов, были выбраны следующие фармакологические средства:

- «МиоАктив Спорт» — специализированный продукт спортивного питания субстратно-метаболического действия [4] (свидетельство о государственной регистрации RU.77.9919.007.E.008152.05.12 от 21.05.2012 г., производитель — ООО НПФ «Мобитек-М», Россия). Продукт добавляется в стандартное кормовое питание лабораторных животных в эквивалентном для человека количестве (1 г/кг массы в сутки, ежедневно на протяжении 21-го дня).

- Полипептидный комплекс для повышения выносливости и работоспособности «ВИР-8» (производитель — ООО НПФ «Мобитек-М», Россия; стандартная доза для биомедицинских исследований — 5 мг/кг; вводится ректально в 0,5 мл р-ра крахмальной слизи, ежедневно на протяжении 5-ти дней).

- Продукт специализированного функционального питания «Фламенко» (RU.77.9 9.88.003.E.007998.07.15, производитель — ООО НПФ «Мобитек-М», Россия), содержащий комплекс кислот цикла Кребса (янтарную, яблочную, фумаровую), катехины экстракта зеленого чая, лецитин, холин, аскорбиновую кислоту, углеводную матрицу (глюкоза+мальтодекстрин). Диапазон его эффективных доз — 50, 75 и 250 мг/кг — был определен в предварительном исследовании без воздействия на животных какого-либо неблагоприятного фактора (рис. 1). Препарат вводится перорально желудочным зондом на протяжении 3-х дней.

- Триметазидин — лекарственный препарат с антигипоксической и антиоксидантной активностью [10] (производитель — «Вертекс», Россия, капсулы по 20 мг; стандартная доза для биомедицинских исследований эффективности — 5 мг/кг; вводится однократно перорально желудочным зондом за 1 ч до исследования).

- Полидигидроксифенилентиосульфат натрия (Гипоксен) — лекарственный препарат с антигипоксической и антиоксидантной активностью, синтетический аналог

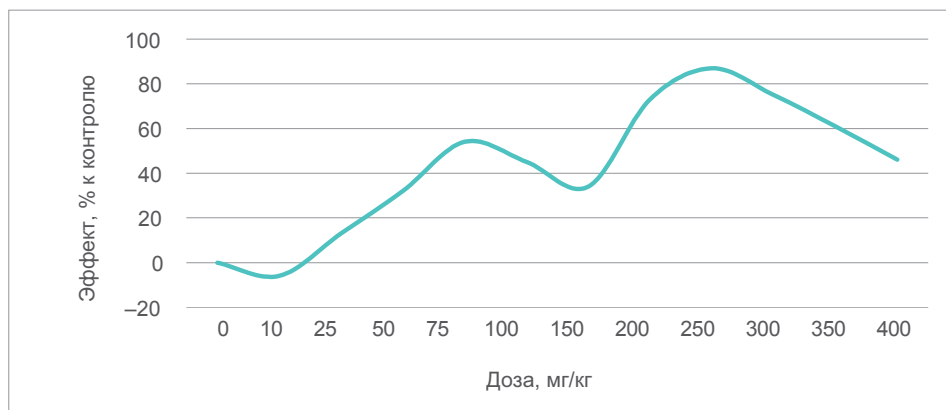


Рис. 1. Кривая «доза — эффект» для БАД «Фламенко» в отношении показателя физической работоспособности животных (тест вынужденного плавания с грузом 10% от массы тела в воде термонеutralной температуры).

Fig. 1. Dose — effect curve for physical capacity index in response to Flamenco nutrition additive, forced swim test with 10% body-weight load in thermoneutral water.

убихинона, повышающий эффективность переноса восстановительных эквивалентов в реакциях митохондриального окисления между комплексами дыхательной цепи (производитель — ЗАО «Корпорация Олифен», Россия; капсулы 250 мг; стандартная доза для биомедицинских исследований эффективности — 50 мг/кг; вводится однократно перорально желудочным зондом за 1 ч до исследования).

В каждую группу экспериментальных животных было рандомизировано по 10 животных. Статистическая обработка результатов исследований осуществлялась методами однофакторного (тест ANOVA) и двухфакторного дисперсионного анализа в пакете статистического анализа данных табличного процессора Excel for Windows. Достоверность отличий оценивалась по F-критерию Фишера, значимость отдельных исследуемых факторов и их взаимодействия — по коэффициенту детерминации D, который показывает, какая доля вариативности показателя может быть связана с влиянием анализируемого контролируемого фактора.

Финальная оценка эффективности средств коррекции комплексного воздей-

ствия гипоксического и температурного (гипертермия, гипотермия) факторов была проведена по индексу защиты (ИЗ), показывающему, какую часть изменений значений анализируемого показателя, возникающего под воздействием неблагоприятного фактора в контрольной группе, компенсирует исследуемое фармакологическое средство. Индекс защиты рассчитывается по среднегрупповым значениям по следующей формуле:

$$ИЗ_{пр} = \frac{X_{пр} - X_k}{X_{инт} - X_k},$$

где X — среднегрупповые значения времени плавания животных с грузом, а индексы обозначают соответствующую группу: инт — интактную, к — контрольную, пр — с применением препарата.

Результаты исследований

Результаты исследования возможности фармакологической коррекции комплексного влияния гипоксии и гипертермии на функциональное состояние лабораторных животных представлены в табл. 1.

Результаты анализа влияния исследуемых препаратов на переносимость гипок-

Таблица 1. Длительность вынужденного плавания животных при воздействии гемической гипоксии и гипертермии (с), а также при введении изучаемых препаратов ($M \pm m$)

Table 1. Forced swim duration in animals with haemic hypoxia — hyperthermia and in response to studied drug agents, s, $M \pm m$

Группа (препарат)	Гипоксия (нормотермия)	Гипоксия+гипертермия	Эффект (% от контроля)
Интактная	72,6±7,0	63,5±7,9	
Контроль	24,4±2,7	16,9±2,3	100
«МيوАктив Спорт»	24,8±2,7	16,9±1,3	+2 (p=0,99)
Полипептидный комплекс	29,8±4,2	16,8±1,5	0 (p=0,99)
«Фламенко», 50 мг/кг	19,3±1,5	10,6±0,9	−37 (p=0,02)
«Фламенко», 75 мг/кг	21,5±5,0	14,6±1,8	−14 (p=0,43)
«Фламенко», 250 мг/кг	20,7±2,8	34,4±4,7	+104 (p=0,003)
Триметазидин	22,7±11,1	87,3±18,2	+418 (p=0,01)
«Гипоксен»	30,1±4,3	22,7±3,5	+34 (p=0,18)

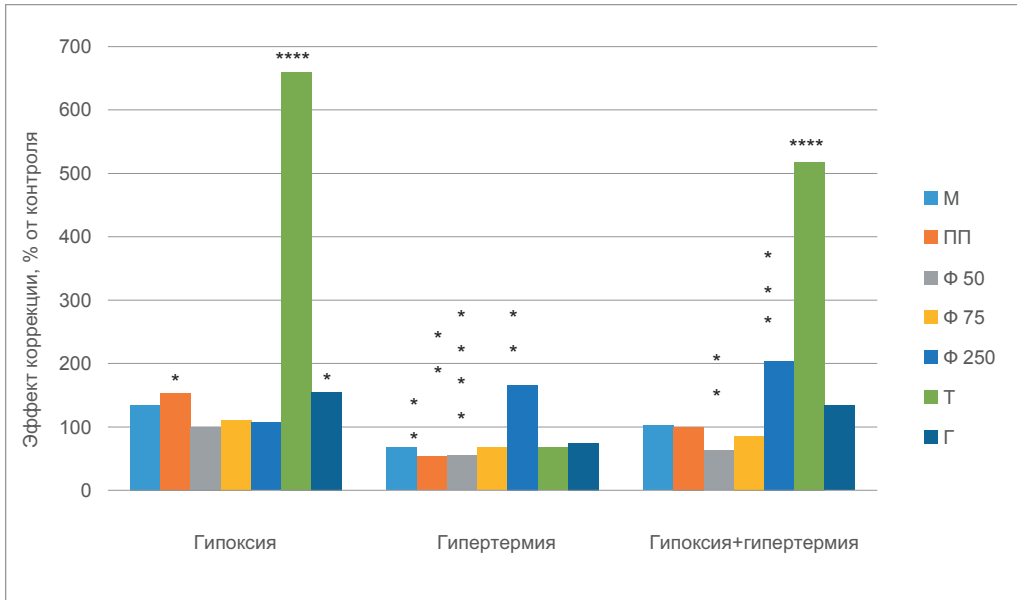


Рис. 2. Влияние исследуемых препаратов на функциональное состояние животных при воздействии неблагоприятных факторов. Обозначения: М — «МيوАктив Спорт»; ПП — пептидный препарат; Ф — «Фламенко», доза 50, 75, 250 мг/кг; Т — триметазидин; Г — «Гипоксен». Отличия от группы контроля достоверны: * — $p < 0,1$; ** — $p < 0,05$; *** — $p < 0,01$; **** — $p < 0,001$.

Fig. 2. Impact of studied drug agents on animal functional state under adverse exposure. Legend: M — “MioActive Sport”, ПП — peptide preparation; Ф — Flamenco 50, 75, 250 mg/kg; Т — trimetazidine; Г — Hypoxen. Significance vs. control group: * — $p < 0,1$; ** — $p < 0,05$; *** — $p < 0,01$; **** — $p < 0,001$.

сии и гипертермии, а также их комплексного воздействия представлены на рис. 2.

В условиях нормотермии (т. е. при исключении влияния температурного фактора) умеренная гемическая гипоксия оказывает существенное влияние на функциональ-

ное состояние белых мышей, резко снижая время плавания животных (практически в 4 раза, $p = 3 \cdot 10^{-7}$). При сопоставлении значений времени плавания животных контрольной группы при нормотермии и гипертермии выявлено умеренное снижение

этого показателя под влиянием теплового воздействия (-31% , $p=0,06$). При совместном воздействии обоих факторов снижение работоспособности, т.е. ухудшение функционального состояния, также было выражено (-77% , $p=6 \cdot 10^{-7}$), но степень этого снижения не имела статистически достоверных различий от вызванного только гипоксией.

Курсовое введение специализированного продукта спортивного питания «**МيوАктив Спорт**» в условиях гипоксии и гипертермии не оказывало защитного действия на показатель физической работоспособности животных. **Полипептидный комплекс** проявлял умеренное ($+51\%$, $p=0,09$) защитное действие в отношении переносимости гипоксии, но не гипертермии. Метаболический комплекс на основе кислот цикла Кребса «**Фламенко**» в исследуемых дозах (50, 75 и 250 мг/кг) не проявил антигипоксической активности, в отношении гипертермии проявлял своеобразный дозозависимый ответ: при дозе 50 мг/кг — снижал время плавания (-37% , $p=0,02$), в дозе 75 мг/кг — практически не влиял на переносимость гипертермии (-14% , $p=0,43$), а в дозе 250 мг/кг — повышал время вынужденного плавания животных ($+104\%$, $p=0,003$). Препарат **триметазидин**, как и ожидалось, проявил выраженную антигипоксическую активность в отношении гемической гипоксии и комплексного воздействия гипоксии и гипертермии ($+560\%$, $p=10^{-10}$; $+418\%$, $p=0,001$, соответственно). Антигипоксическое действие «**Гипоксена**» было выражено умеренно ($+55\%$, $p=0,09$), но в условиях комплексного воздействия гипоксии и гипертермии его выраженность снижалась ($+34\%$ к уровню контроля, $p=0,18$) и становилась статистически не значимой.

Для оценки возможного влияния исследуемых препаратов на функциональное состояние животных при комплексном воздействии гипоксии и гипертермии был выполнен

двухфакторный дисперсионный анализ, результаты которого отражены в табл. 2.

Результаты исследования возможности фармакологической коррекции комплексного влияния гипоксии и гипотермии на функциональное состояние лабораторных животных представлены в табл. 3.

Результаты анализа влияния исследуемых препаратов на переносимость гипоксии и гипотермии, а также их комплексного воздействия представлены на рис. 3.

Для оценки возможного влияния исследуемых препаратов на функциональное состояние животных при комплексном воздействии гипоксии и гипертермии был выполнен двухфакторный дисперсионный анализ, результаты которого отражены в табл. 4.

По способности снижать влияние гипотермии изучаемые препараты могут быть распределены на две группы: 1) с относительно слабым (полипептидный комплекс и гипоксен) фригопротекторным (т.е. повышающим переносимость охлаждения) действием; 2) с умеренным позитивным влиянием («МيوАктив Спорт», «Фламенко» в трех исследованных дозах). Важной особенностью влияния этого фармакологического средства является одновременное позитивное влияние как на переносимость гипотермии, так и на способность усиливать взаимодействие факторов, правда, умеренной выраженности.

Обсуждение результатов

Сопоставление значений коэффициентов детерминации между группами показало, что контролируемые факторы (гипоксия и гипертермия) на фоне приема фармакологических средств в основном выступают как независимые, практически не взаимодействующие факторы. При этом наиболее существенную роль в вариативности времени плавания животных играет гипоксический фактор. Полученные данные согласуются с результатами исследований

Таблица 2. Оценка влияния комплексного воздействия гипоксии и гипертермии на физическую работоспособность лабораторных животных (двухфакторный дисперсионный анализ)

Table 2. Hypoxic hyperthermal impact on physical capacity in laboratory animals (two-factor analysis of variance)

Препарат	Фактор	Влияние (D)	Уровень значимости (p)
Контроль	Гипоксия	0,61	2*10⁻⁹
	Гипертермия	0,04	0,05
	Взаимодействие	0,002	0,69
	Неконтролируемые	0,35	
«МиоАктив Спорт»	Гипоксия	0,65	5*10⁻¹⁰
	Гипертермия	0,02	0,13
	Взаимодействие	0,001	0,92
	Неконтролируемые	0,33	
Полипептидный препарат	Гипоксия	0,61	3*10⁻⁹
	Гипертермия	0,04	0,06
	Взаимодействие	0,001	0,74
	Неконтролируемые	0,36	
«Фламенко», 50 мг/кг	Гипоксия	0,71	8*10⁻¹²
	Гипертермия	0,02	0,10
	Взаимодействие	0,001	0,97
	Неконтролируемые	0,26	
«Фламенко», 75 мг/кг	Гипоксия	0,61	5*10⁻¹⁰
	Гипертермия	0,02	0,18
	Взаимодействие	0,002	0,86
	Неконтролируемые	0,33	
«Фламенко», 250 мг/кг	Гипоксия	0,54	6*10⁻⁸
	Гипертермия	0,002	0,70
	Взаимодействие	0,04	0,06
	Неконтролируемые	0,42	
Триметазидин	Гипоксия	0,21	0,002
	Гипертермия	0,09	0,04
	Взаимодействие	0,03	0,18
	Неконтролируемые	0,67	
«Гипоксен»	Гипоксия	0,56	4*10⁻⁸
	Гипертермия	0,02	0,17
	Взаимодействие	0,001	0,87
	Неконтролируемые	0,42	

Таблица 3. Длительность вынужденного плавания животных при воздействии гемической гипоксии и гипотермии (с), а также введении изучаемых препаратов (M±m)

Table 3. Forced swim duration in animals with haemic hypoxia — hypothermia and in response to studied drug agents, s, M±m

Группа	Гипоксия (нормотермия)	Гипоксия+гипотермия	Эффект (% от контроля)
Интактная	72,6±7,0	5,6±0,7	
Контроль	24,4±2,7	4,5±0,4	100
«МиоАктив Спорт»	24,8±2,7	18,4±1,5	+308 (p=2*10⁻¹¹)
Полипептидный комплекс	29,8±4,2	12,5±1,3	+178 (p=0,0002)
«Фламенко», 50 мг/кг	19,3±1,5	9,5±1,1	+111 (p=2*10⁻¹²)
«Фламенко», 75 мг/кг	21,5±5,0	12,9±0,8	+187 (p=2*10⁻¹⁰)
«Фламенко», 250 мг/кг	20,7±2,8	6,9±1,0	+53 (p=2*10⁻¹²)
Триметазидин	22,7±11,1	6,7±0,3	+49 (p=2*10⁻¹⁷)
«Гипоксен»	30,1±4,3	10,0±0,9	+120 (p=3*10⁻⁵)

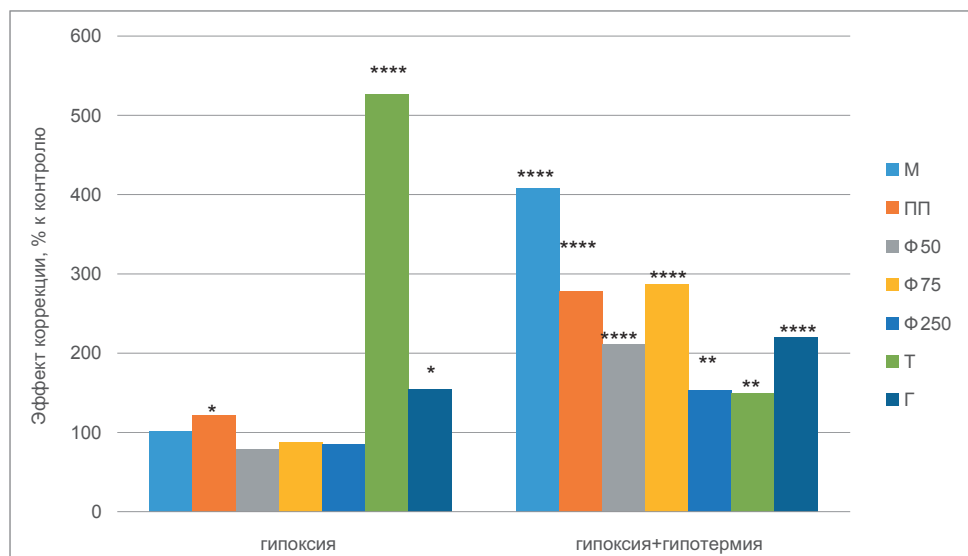


Рис. 3. Влияние исследуемых препаратов на функциональное состояние животных при воздействии неблагоприятных факторов. Обозначения: М — «МيوАктив Спорт»; ПП — пептидный препарат; Ф — «Фламенко», доза 50, 75, 250 мг/кг; Т — триметазидин; Г — «Гипоксен». Отличия от группы контроля достоверны: * — $p < 0,1$; ** — $p < 0,05$; *** — $p < 0,01$; **** — $p < 0,001$.

Fig. 3. Impact of studied drug agents on animal functional state under adverse exposure. Legend: М — “MioActive Sport”; ПП — peptide preparation; Ф — Flamenco 50, 75, 250 mg/kg; Т — trimetazidine; Г — Hypoxen. Significance vs. control group: * — $p < 0,1$; ** — $p < 0,05$; *** — $p < 0,01$; **** — $p < 0,001$.

[7, 13–15], в которых подчеркивается ключевая роль гипоксемии и сниженных способностей тканей к поглощению кислорода в инициации комплекса дезадаптации.

Выраженное антигипоксическое действие триметазидина снижает роль гипоксического фактора в вариативности показателя функционального состояния животных (коэффициент детерминации снижается с 0,61 до 0,21), что закономерно компенсируется ростом влияния неконтролируемых факторов (на 0,35 ед.) и фактора гипертермии (на 0,05 ед.). Вторым препаратом, в отношении которого отмечено умеренное позитивное влияние на гипоксический фактор, является комплекс субстратов цикла Кребса «Фламенко» в высокой дозе (снижение коэффициента детерминации по гипоксическому фактору на 0,07 ед.). Его одновременное позитивное влияние как на переносимость гипоксии, так и на переносимость гипертермии, правда,

умеренной выраженности, представляет несомненный интерес, т.к. отражает универсальный механизм неспецифической резистентности к нескольким неблагоприятным воздействиям, связанный с повышением энергетических возможностей клеток за счет активации митохондриального окислительного фосфорилирования.

Обращает на себя внимание то, что значимость факторов гипоксии и гипертермии при приеме комплексного субстратного («МيوАктив Спорт») и регуляторного (полипептидный комплекс) стимулятора работоспособности не отличалась от характерной для контрольной группы, что отражает зависимость их эффективности от аэробных возможностей организма.

Гипотермия оказывает крайне негативное влияние на функциональное состояние животных: по сравнению с интактными животными время плавания с грузом 5% от массы тела снижается в 13 раз, с 72,6 до 5,61 мин

Таблица 4. Оценка влияния комплексного воздействия гипоксии и гипотермии на физическую работоспособность лабораторных животных (двухфакторный дисперсионный анализ)

Table 4. Hypoxic hypothermal impact on physical capacity in laboratory animals (two-factor analysis of variance)

Препарат	Фактор	Влияние (D)	Уровень значимости (p)
Контроль	Гипоксия	0,13	$2 \cdot 10^{-6}$
	Гипотермия	0,61	$2 \cdot 10^{-14}$
	Взаимодействие	0,12	$4 \cdot 10^{-8}$
	Неконтролируемые	0,14	
«МيوАктив Спорт»	Гипоксия	0,10	$7 \cdot 10^{-5}$
	Гипотермия	0,43	$3 \cdot 10^{-11}$
	Взаимодействие	0,30	$3 \cdot 10^{-9}$
	Неконтролируемые	0,17	
Полипептидный препарат	Гипоксия	0,10	10^{-4}
	Гипотермия	0,53	$5 \cdot 10^{-12}$
	Взаимодействие	0,19	$8 \cdot 10^{-7}$
	Неконтролируемые	0,19	
«Фламенко», 50 мг/кг	Гипоксия	0,14	$7 \cdot 10^{-8}$
	Гипотермия	0,42	$2 \cdot 10^{-12}$
	Взаимодействие	0,25	$3 \cdot 10^{-9}$
	Неконтролируемые	0,20	
«Фламенко», 75 мг/кг	Гипоксия	0,14	$2 \cdot 10^{-5}$
	Гипотермия	0,42	$2 \cdot 10^{-10}$
	Взаимодействие	0,25	$8 \cdot 10^{-8}$
	Неконтролируемые	0,20	
«Фламенко», 250 мг/кг	Гипоксия	0,18	10^{-7}
	Гипотермия	0,47	$2 \cdot 10^{-12}$
	Взаимодействие	0,20	$4 \cdot 10^{-8}$
	Неконтролируемые	0,15	
Триметазидин	Гипоксия	0,06	10^{-4}
	Гипотермия	0,74	$2 \cdot 10^{-16}$
	Взаимодействие	0,06	10^{-4}
	Неконтролируемые	0,13	
«Гипоксен»	Гипоксия	0,11	$5 \cdot 10^{-5}$
	Гипотермия	0,55	$2 \cdot 10^{-10}$
	Взаимодействие	0,16	$2 \cdot 10^{-6}$
	Неконтролируемые	0,18	

($p=2 \cdot 10^{-8}$). Дополнительное воздействие гипоксии еще на 20% снижает работоспособность животных — с 5,6 до 4,5 мин ($D=0,10$; $p=0,16$), что не является статистически достоверным, но может отражать эффект взаимного отягощения при одновременном воздействии обоих факторов. В данной экспериментальной модели ведущую роль играет не фактор гипоксии, как в гипертермической серии исследований, а именно фактор гипотермии. Сопоставление значений коэффициентов

детерминации между группами показало, что контролируемые факторы (гипоксия и гипотермия) вступают в значимое взаимодействие во всех группах экспериментальных животных, что отражает выраженный эффект взаимного отягощения. Следовательно, гипотермия, снижая лабильность клеточных мембран и резко активизируя расход энергии в термогенном нефосфорилирующем окислении, будет усиливать негативное действие гемической гипоксии на организм [5, 8, 9].

Таблица 5. Индексы защиты для изучаемых препаратов в исследованиях комплексного воздействия гемической гипоксии и температурного фактора

Table 5. Protection indices for studied drug agents in haemic hypoxic thermal response

Препарат	Комплексное воздействие гипоксии и	
	гипертермии	гипотермии
«МيوАктив Спорт»	0	0,20 *!
Полипептидный комплекс	0	0,11 *
«Фламенко», 50 мг/кг	0	0,07
«Фламенко», 75 мг/кг	0	0,12 *
«Фламенко», 250 мг/кг	0,31 *	0,04
Триметазидин	1,26 *!	0,03
«Гипоксен»	0,10	0,08

Примечание: * — применение возможно; *! — рекомендуется в первую очередь.

Note: * — application feasible; *! — primarily recommended.

Необходимо отметить, что выраженное антигипоксическое действие триметазида и в гипотермической серии снижает вклад гипоксического фактора в вариативность показателя функционального состояния животных (коэффициент детерминации снижался с 0,13 до 0,06), что закономерно компенсировалось ростом влияния фактора гипотермии (на 0,13 ед.). Наиболее выраженное влияние исследуемые препараты оказывают на переносимость охлаждающего воздействия (но не гипоксии), что проявляется снижением коэффициента детерминации для фактора гипотермии.

В отличие от состояния гипертермии, в условиях совместного влияния гемической гипоксии и гипотермии все исследуемые препараты способствовали статистически достоверному улучшению функционального состояния и работоспособности животных. По выраженности корригирующего эффекта исследуемые препараты могут быть объединены в 3 группы: со слабым защитным действием (150–200% к уровню контроля — Фламенко, 250 мг/кг; триметазидин), с умеренным защитным действием (200–300% к уровню контроля — полипептидный комплекс; Фламенко, 50 и 75 мг/кг; Гипоксен) и более высоким уровнем эф-

фекта (более 300% — курсовое введение специализированного продукта спортивного питания «МيوАктив Спорт»).

Для интегральной оценки активности исследованных препаратов на функциональное состояние животных были рассчитаны индексы защиты (табл. 5).

Обращает на себя внимание, что ни один из исследованных препаратов не оказал универсального протекторного действия, а защитное действие препаратов дифференцируется по температурному фактору. Действие препарата «Гипоксен» в дозе 50 мг/кг при совместном влиянии гипоксического и температурного факторов не было статистически достоверным.

Закключение

Таким образом, для коррекции функционального состояния при комплексном воздействии гипоксии и гипертермии могут быть рекомендованы препараты триметазида в дозе 5 мг/кг и Фламенко в дозе 250 мг/кг, а для коррекции комплексного воздействия гипоксии и гипотермии — курсовое применение комплекса спортивного питания «МيوАктив Спорт», Полипептидный комплекс и Фламенко в дозе 75 мг/кг.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Каркищенко В.Н., Каркищенко Н.Н., Шустов Е.Б., Берзин И.А., Фокин Ю.В., Алимкина О.В. Особенности интерпретации показателей физической работоспособности лабораторных животных по показателям плавательных тестов. *Биомедицина*. 2016;4:34–46. [Karkischenko V.N., Karkischenko N.N., Shustov E.B., Berzin I.A., Fokin Yu.V., Alimkina O.V. Osobennosti interpretatsii pokazatelej fizicheskoy rabotosposobnosti laboratornykh zhivotnykh po pokazatelyam plavatel'nykh testov [Features of interpretation of indicators of physical performance of laboratory animals according to indicators of swimming tests]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2016;4:34–46. (In Russian)].
2. Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н., Шустов Е.Б., Капанадзе Г.Д., Ревякин А.О., Семенов Х.Х., и др. *Биомедицинское (доклиническое) изучение антигипоксической активности лекарственных средств: метод. реком. МР21-44-2017*. М.: ФМБА России, 2017:98. [Karkischenko N.N., Karkischenko V.N., Shustov E.B., Kapanadze G.D., Revyakin A.O., Semenov Kh.Kh., et al. *Biomeditsinskoe (doklinicheskoe) izuchenie antigipoksicheskoy aktivnosti lekarstvennykh sredstv [Biomedical (preclinical) study of antihypoxic activity of drugs]: metod. rekom. MR21-44-2017*. M.: FMBA Rossii, 2017:98. (In Russian)].
3. Каркищенко Н.Н., Уйба В.В., Каркищенко В.Н., Шустов Е.Б. *Очерки спортивной фармакологии. Т. 1. Векторы экстраполяции*. М., СПб: Айсинг, 2013:288. [Karkischenko N.N., Ujba V.V., Karkischenko V.N., Shustov E.B. *Ocherki sportivnoy farmakologii. T. 1. Vektory ekstrapolyatsii [Essays on sports pharmacology. V. 1. Extrapolation vectors]*. M., St. Petersburg: Icing Publ, 2013:288. (In Russian)].
4. Новиков В.С., Каркищенко В.Н., Шустов Е.Б. *Функциональное питание человека при экстремальных воздействиях*. СПб.: Политехника-принт, 2017:346. [Novikov V.S., Karkischenko V.N., Shustov E.B. *Funktsional'noe pitaniye cheloveka pri ekstremal'nykh vozdeystviyakh [Functional nutrition of a person under extreme impacts]*. St. Petersburg: Polytekhniko-print Publ., 2017:346. (In Russian)].
5. Новиков В.С., Сороко С.И., Шустов Е.Б. *Деадаптационные состояния человека при экстремальных воздействиях и их коррекция*. СПб.: Политехника-принт, 2018:548. [Novikov V.S., Soroko S.I., Shustov E.B. *Dezadaptatsionnye sostoyaniya cheloveka pri ekstremal'nykh vozdeystviyakh i ih korrektsiya [Deadaptation states of a person under extreme impacts and their correction]*. St. Petersburg: Polytekhniko-print Publ., 2018:548. (In Russian)].
6. Оковитый С.В., Петрова Н.В., Шустов Е.Б., Белых М.А., Кириллова Н.В., Спасенкова О.Н. и др. Методология совместного анализа одновременно протекающих патологических процессов у лабораторных животных. *Биомедицина*. 2019;15(4):82–97. [Okovityj S.V., Petrova N.V., Shustov E.B., Belyh M.A., Kirillova N.V., Spasenkova O.N., et al. Metodologiya sovmestnogo analiza odnovenno protokayushchikh patologicheskikh processov u laboratornykh zhivotnykh [The methodology of joint analysis of simultaneous processing pathological processes in laboratory animals]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2019;15(4):82–97. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-4-82-97>. (In Russian)].
7. Ainslie P.N., Poulin M.J. Ventilatory, cerebrovascular, and cardiovascular interactions in acute hypoxia: regulation by carbon dioxide. *J. Appl. Physiol.* 2004;97(1):149–159.
8. Barlunkowa R., Jansky L., Mejsnar I. Nonshivering thermogenesis and cold adaptation. *Nonshivering thermogenesis*. Ed. L. Jansky. Pr.: Academia, 1971:39–55.
9. Cooper D.M., Barstow T.J., Bergner A., Lee W.N. Blood glucose turnover during high- and low-intensity exercise. *Am. J. Physiol.* 1989;257(3(1)):405–412.
10. De Groot V., Beckerman H., Lankhorst G.J., Bouter L.M. How to measure comorbidity: a critical review of available methods. *J. Clin. Epidemiol.* 2003;56(3):221–229.
11. De Leiris J., Boucher F. Intervention in ischemia. Reperfusion syndrome. Rationale for trimetazidine. *Rev. Port. Cardiol.*, 1994;13(9):661–667.
12. *European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes* (ETS 123), Strasbourg, 1986.
13. Fukuda R., Zhang H., Kim J.W., Shimoda L., Dang C.V., Semenza G.L. HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. *Cell*. 2007;129(1):111–122.
14. Goodall S., Twomey R., Amann M. Acute and chronic hypoxia: implications for cerebral function and exercise tolerance. *Fatigue*. 2014;2:73–92.
15. Guyenet P.G. Regulation of breathing and autonomic outflows by chemoreceptors. *Compr. Physiol.* 2014; 4:1511–1562.
16. Hayward I.S. *The physiology of immersion hypothermia / The nature and treatment of hypothermia*. London: Groom Helm., 1993:26–28.
17. Heerlein K., Schulze A., Hotz L., Bartsch P., Mairbäurl H. Hypoxia decreases cellular ATP demand and inhibits mitochondrial respiration of a549 cells. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 2005;32(1):44–51.
18. Sarkar S., Banerjee P.K., Selvarumthy W. High altitude hypoxia: an intricate interplay of oxygen responsive macroevents and micromolecules. *Mol. Cel. Biochem.* 2003;253:287–305.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Шустов Евгений Борисович*, д.м.н., проф.,
ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии им. акад. С.Н. Голикова ФМБА России»,
ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России;

e-mail: shustov-msk@mail.ru

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

e-mail: fokin@scbmt.ru

Люблинский Станислав Людвигович, к.б.н.,
ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;

e-mail: mobitek-m@mail.ru

Алимкина Оксана Владимировна, ФГБУН
«Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;

e-mail: alimkina@scbmt.ru

Ким Алексей Евгеньевич, к.м.н., ФГБВО
ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Минобороны России;

e-mail: alexpann@mail.ru

Ивкин Дмитрий Юрьевич, к.б.н., ФГБОУ ВО
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России;

e-mail: dmitry.ivkin@pharminnotech.com

Матвеевко Елена Леонидовна, к.э.н., доц.,
ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;

e-mail: matveyenkoel@mail.ru

Ивкина Арина Сергеевна, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России;

e-mail: arina.ivkina@pharminnotech.com

Плиско Григорий Алексеевич, ФГБОУ ВО
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России;

e-mail: Grigoriy.Plisko@pharminnotech.com

Поверяева Марина Андреевна, ФГБОУ ВО
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России;

e-mail: poveryaeva.marina@pharminnotech.com

Evgeny B. Shustov*, Dr. Sci (Med.), Prof.,
S.N. Golikov Research and Clinical Centre for Toxicology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia, Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health care of Russia;

e-mail: shustov-msk@mail.ru

Yuriy V. Fokin, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: fokin@scbmt.ru

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

e-mail: mobitek-m@mail.ru

Oksana V. Alimkina, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: alimkina@scbmt.ru

Aleksej E. Kim, Cand. Sci. (Med.), Military Medical Academy named after S.M. Kirov of the Ministry of Defense of Russia;

e-mail: alexpann@mail.ru

Dmitriy Yu. Ivkin, Cand. Sci. (Biol.), Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health care of Russia;

e-mail: dmitry.ivkin@pharminnotech.com

Elena L. Matveyenko, Cand. Sci. (Econ.), Assoc. Prof., Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: matveyenkoel@mail.ru

Arina S. Ivkina, Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health care of Russia;

e-mail: arina.ivkina@pharminnotech.com

Grigory A. Plisko, Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health care of Russia;

e-mail: Grigoriy.Plisko@pharminnotech.com

Marina A. Poveryaeva, Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health care of Russia;

e-mail: poveryaeva.marina@pharminnotech.com

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

<https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-1-70-81>

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И ИНДУЦИРОВАННЫЕ МОДЕЛИ ЖИВОТНЫХ С ДЕГЕНЕРАЦИЕЙ СЕТЧАТКИ

С.С. Байгильдин^{1, 2, *}, Л.А. Мусина³, З.Р. Хисматуллина²

¹ ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека»
450106, Российская Федерация, Уфа, ул. Степана Кувыкина, 94

² ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет»
450076, Российская Федерация, Уфа, ул. Заки Валиди, 32

³ ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии» Минздрава России
420075, Россия, Уфа, ул. Зорге, 67/1

Дегенерации сетчатки представляют собой обширную и гетерогенную группу заболеваний (дистрофий) сетчатки, которые приводят к прогрессирующей потере зрения. Одновременно с развитием новых методов экспериментальной терапии (генной и клеточной терапии, регенеративной офтальмохирургии) возрастает потребность в экспериментальных моделях. В обзоре рассматриваются различные животные модели дегенеративных заболеваний сетчатки глаза человека. Индуцированные и генетические экспериментальные модели имеют свои преимущества и недостатки, освещающиеся в обзоре. Адекватный выбор экспериментальной модели может способствовать патогенетическому подходу лечения заболеваний сетчатки.

Ключевые слова: моделирование дегенерации сетчатки, экспериментальные животные, генетические модели, индуцированные модели, пигментный ретинит, возрастная макулярная дегенерация

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Байгильдин С.С., Мусина Л.А., Хисматуллина З.Р. Генетические и индуцированные модели животных с дегенерацией сетчатки. *Биомедицина*. 2021;17(1):70–81. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-1-70-81>

Поступила 30.03.2020

Принята после доработки 14.12.2020

Опубликована 10.03.2021

EXPERIMENTAL ANIMAL MODELS OF RETINAL DEGENERATION

Samat S. Baygildin^{1, 2, *}, Lyalya A. Musina³, Zukhra R. Khismatullina²

¹ Ufa Research Institute of Occupational Health and Human Ecology
450106, Russian Federation, Ufa, Kuvykin Street, 94

² Bashkir State University
450076, Russian Federation, Ufa, Zaki Validi Street, 32

³ Russian Eye and Plastic Surgery Centre of the Ministry of Health care of Russia
420075, Russian Federation, Ufa, Zorge Street, 67/1

Retinal degenerations comprise a large heterogeneous class of diseases (dystrophies) of retina leading to a progressive vision loss. The emergence of new experimental therapies (gene and cell therapy, regenerative ophthalmic surgery) generates a demand for new experimental models. The review tackles various animal models of human retinal degenerative diseases. Pros and contras of induced and genetic experimental models are highlighted. An adequate experimental model choice may condition a pathogenetic approach to retinal disease therapy.

Keywords: retinal degeneration modelling, experimental animals, genetic models, induced models, retinitis pigmentosa, age-related macular degeneration

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

For citation: Baygildin S.S., Musina L.A., Khismatullina Z.R. Experimental Animal Models of Retinal Degeneration. *Journal Biomed.* 2021;17(1):70–81. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-1-70-81>

Submitted 30.03.2020

Revised 14.12.2020

Published 10.03.2021

Введение

Дегенерации сетчатки представляют собой обширную и гетерогенную группу дистрофических и деструктивных заболеваний сетчатки, которые приводят к прогрессирующей потере зрения [12, 13]. Наследственные дегенеративные заболевания сетчатки в основном моногенные [12]. Согласно базе данных RetNet [24], на сегодняшний день выяснено, что в развитие этих заболеваний вовлечен 271 ген. Помимо моногенных заболеваний, таких как врожденный амавроз Лебера, болезнь Штаргардта и пигментный ретинит (ПР), дегенерации сетчатки охватывают многофакторные заболевания, такие как возрастная макулярная дегенерация (ВМД) [44]. В настоящее время не существует стопроцентно эффективного лечения дегенеративных заболеваний сетчатки, однако развитие генной и клеточной терапии, а также регенеративной офтальмохирургии дает надежду на решение этой проблемы [3, 29, 43, 44]. Одновременно с развитием новых методов экспериментальной и клинической терапии возрастает потребность в животных моделях [29].

Существует большое количество животных моделей офтальмологических патологий человека. Хотя глаза приматов наиболее схожи по строению с глазами человека, использование этих животных затруднительно в силу этических и материальных причин. Объектами экспериментальной офтальмологии часто выбирают крыс (невысокая стоимость, васкуляризация сетчатки схожа с человеческой), кроликов (размеры глазного яблока удобны для хирургического вмешательства), кошек и собак (схожесть структуры слоев сетчатки с человеческой), свиней

(схожесть сетчатки с человеческой по размеру, структуре и распределению фоторецепторов) [13, 29]. Однако мышинные модели имеют огромное количество генетических вариаций и мутаций, что делает их удобными объектами для исследования наследственных ретинопатий [13, 29]. Маленький размер глаза мыши строго ограничивает некоторые подходы, особенно когда требуются хирургические процедуры [10, 29]. У грызунов отмечается раннее появление многих дегенеративных заболеваний сетчатки, что предполагает использование крайне маленького глаза мышонка [29]. Также относительно простая доставка нейротрофических факторов при интравитреальных инъекциях может быть неэффективной из-за маленьких размеров глаз. Объем же глаза крысы в 6–12 раз (в зависимости от возраста) превышает объем глаза мыши, поэтому больший размер глаза крысы более удобен для исследования [29]. Появление эндонуклеазных методов и технологий редактирования генома позволило получать крупных генетически модифицированных животных — кроликов. Более ранний метод получения таких животных — классический трансгенез — был низкоэффективным [4].

Патологические процессы в сетчатке человека могут быть воссозданы как с помощью генетических, так и индуцированных экспериментальных моделей. Индуцированные модели, полученные в результате химического, физического и биологического воздействия, обладают приближенностью морфологических изменений сетчатки к дегенеративно-дистрофическим заболеваниям сетчатки человека и могут также моделировать вторичные

дистрофии, связанные с циркуляторными расстройствами в системе центральной артерии и центральной вены сетчатки [5].

Генетические модели общей дегенерации сетчатки

Пигментный ретинит (ПР)

ПР — это гетерогенная группа дегенеративных болезней сетчатки с полиморфным наследственным происхождением, вызывающих прогрессирующую потерю функции сетчатки [14]. Различные формы наследственного ПР поражают до 1:3500 людей во всем мире [29]. Генетические модели дегенерации сетчатки бывают естественного (спонтанного) происхождения и трансгенные. Естественные модели для ПР обычно ограничены аутосомно-рецессивными формами. Животные модели для других, более редких форм ПР, могут быть получены только посредством генетической модификации [13]. В настоящее время идентифицировано около 65-ти генов, ассоциированных с ПР [24]. В одном только гене родопсина было идентифицировано более 150-ти различных мутаций, причем P23H является одной из наиболее распространенных мутаций родопсина [29]. Сейчас известно, что мутация P23H вызывает нарушенный фолдинг (сворачивание полипептидной цепи в определенную пространственную структуру) родопсина и удержание его в эндоплазматической сети [15, 29]. В некоторых исследованиях также указывается на такой механизм ПР, при котором клеточный стресс вызывает воспалительный ответ и последующее ремоделирование сетчатки, а также апоптоз [14]. Аналогичные механизмы были обнаружены и в других формах дегенерации сетчатки, развивающихся при глаукоме, диабетической ретинопатии и ВМД [14].

Трансгенные крысы P23H были созданы для воспроизведения человеческого ПР [29]. Несмотря на первоначальное проявление нормальной функции колбо-

чек, у этих крыс развивается прогрессирующая дисфункция палочек [15]. Потеря фоторецепторов сопровождается дегенерацией внутренней сетчатки [14]. Линии P23H-1, P23H-2, P23H-3 различаются по скорости дегенерации сетчатки (умеренная, медленная, очень медленная), тогда как скорость дегенерации сетчатки других трансгенных крыс S334ter различается от очень медленной до крайне быстрой [29]. У крыс S334ter обнаруживается нарушение транспорта родопсина.

Экспериментальные крысы RSC — классическая модель рецессивно унаследованной дегенерации сетчатки, в которой пигментный эпителий сетчатки (ПЭС) не фагоцитирует отработанные наружные сегменты, и впоследствии клетки фоторецепторов погибают [15]. У крыс RSC, с делецией в гене *MERTK*, отсутствует рецептор MERTK, опосредующий фагоцитоз наружных сегментов [15]. Токсичное накопление отработанных сегментов приводит к апоптозу фоторецепторных клеток и массовой гибели клеток в наружном ядерном слое сетчатки крыс RCS. В отличие от крыс P23H, в этой модели из-за дисфункции ПЭС дегенерация начинается одновременно в колбочковых и палочковых фоторецепторах, а скорость дегенерации медленнее, чем у крыс P23H [15].

Генетически детерминированной дистрофией ПЭС глаза на фоне функциональной недостаточности дофаминергической системы мозга характеризуются и крысы линии WAG/Rij, известные также как экспериментальная модель абсансной эпилепсии [6, 40]. Установлено, что в сетчатке крыс линии WAG/Rij патологические изменения начинаются ближе к 20-м сут после рождения [1].

Другой моделью ПР являются собаки породы английский мастифф с мутацией Thr4Arg в гене родопсина. Как и у людей с мутацией в гене родопсина, у этих собак обнаруживаются замедленное время вос-

становления функции палочковых фоторецепторов после воздействия света и характерная картина дегенерации сетчатки [8]. Также была разработана кроличья модель ауtosомно-доминантного ПР с мутацией Pro347Leu в гене родопсина, у которой гибель фоторецепторов (ФР) была более выраженной в центральной части сетчатки [8, 9]. У трансгенных свиней с аналогичной мутацией в гене родопсина наблюдается ранняя и тяжелая потеря палочек, с более поздней дегенерацией колбочек, что также наблюдается у пациентов с ПР [8].

Абиссинские кошки используются в качестве модели ауtosомно-рецессивной дегенерации сетчатки. У них наблюдается нормальное зрение при рождении, в 5–8 мес. обнаруживаются первые морфологические изменения в отдельных палочковых фоторецепторах. По мере прогрессирования заболевания вовлекаются и колбочковые ФР. На конечной стадии, обычно в возрасте от 3-х до 5-ти лет, наблюдаются полная дегенерация ФР и слепота. Ответственную за дегенерацию сетчатки у этих кошек мутацию в гене *CEP290* связывают и с другими заболеваниями: синдромом Жубера и врожденным амаврозом Лебера у людей, а также дегенерацией сетчатки у мышей rd16 [8]. У бенгальских кошек также была обнаружена дегенерация сетчатки, однако, в отличие от абиссинских кошек, изменения были более выражены в центральной части сетчатки [39].

Врожденный амавроз Лебера

Врожденный амавроз Лебера — один из самых клинически тяжелых дегенераций сетчатки. Данное заболевание может вызвать полную слепоту уже в детстве. Одной из причин развития амавроза Лебера может быть мутация в гене *RPE65*. Естественной животной моделью является собака *RPE65^{-/-}*, страдающая от ранних тяжелых нарушений зрения. Зрительная активность в этой животной модели была восстановлена заменой гена с помощью

рекомбинантного адено-ассоциированного вируса (AAV) [7]. Улучшение зрения также наблюдалось у части пациентов с амаврозом Лебера при генной терапии с использованием вектора рекомбинантного адено-ассоциированного вируса [32], хотя также показано [11] ухудшение зрения после достижения некоего пика улучшения.

Гиперфункция S-колбочек

У мутантных мышей rd7, не имеющих транскрипционного фактора Nr2e3, обнаруживают ретинопатию, вызванную мутацией в том же гене, как и при синдроме Гольдмана—Фавра (тяжелый случай гиперфункции S-колбочек, при котором усиливается функция S-колбочек) [22]. Одномесячные гомозиготные мутантные мыши rd7 имеют белые пятна по всей сетчатке, исчезающие с возрастом. В наружном ядерном слое сетчатки обнаруживаются розетки. Эти розетки сглаживаются на 5-м мес. и исчезают на 16-м мес. Сглаживание розеток согласуется с исчезновением пятен сетчатки. Наблюдается также прогрессирующая дегенерация сетчатки. Иммуногистохимически показано увеличение количества колбочковых клеток [22].

Липофусциноз нейронов

В этой группе наследственных болезней наблюдается накопление autofлюоресцирующего вещества, липофусциноподобного цероида в лизосомах. Часто первые заметные признаки болезни — это потеря зрения. Группа болезней ассоциирована с мутациями в 13-ти различных генах. Были разработаны несколько мышинных моделей липофусциноза нейронов. Например, у мышей с мутацией в *CLN5* обнаруживается тяжелая ретинопатия с ранней гибелью фоторецепторных клеток, накоплением autofлюоресцирующего вещества и сильным воспалением [30].

Синдром Барде—Бидля

У мышей, лишенных экспрессии генов *BBS2*, обнаружено нормальное развитие сетчатки с последующим апоптозом ФР,

клеток сетчатки с цилией [36]. Эти признаки повторяют главные особенности проявления синдрома у людей. Гибели фоторецепторных клеток предшествует неправильная локализация родопсина, что свидетельствует о дефекте его транспорта [36].

Генетические модели дегенерации центральной части сетчатки

Возрастная макулярная дегенерация

Возрастная макулярная дегенерация является полигенным заболеванием, причина которой — множество наследственных и средовых факторов [41]. Отличительным признаком ранней ВМД является наличие отложений между ПЭС и хориоидеей, называемых друзами. Прогрессирование заболевания характеризуется атрофическими изменениями ПЭС и вышележащих ФР и/или хориоидальной неоваскуляризацией в макуле [19]. Данное заболевание поражает до 25% людей, достигших 75-ти лет [29].

Имеются некоторые ограничения в использовании грызунов в качестве экспериментальной модели ВМД. У них нет ни макулы, ни фовеа, а также отложения образуются над ПЭС, а не под ним. И эти отложения имеют другой состав. Друзы с таким же составом и расположением как у человека обнаруживаются у приматов [19]. Однако развитие таких слоистых отложений было выявлено под ПЭС трансгенных мышей, у которых избыточно экспрессировался *apoB100* [18]. Эти мыши содержались на жирной диете и подвергались нефототоксичному воздействию аргонного лазера.

У мышей *SOD1^{-/-}* с недостаточностью Cu, Zn-супероксид дисмутазы были обнаружены возрастные изменения сетчатки, подобные основным признакам человеческой ВМД, в т.ч. друзы, утолщения мембраны Бруха и неоваскуляризация сосудистой оболочки глаза. Количество друз увеличи-

валось с возрастом. В ПЭС обнаруживали признаки окислительного повреждения [19].

У преждевременно стареющих крыс OXYS развивается ретинопатия, с точки зрения клинических проявлений и морфологических характеристик соответствующая сухой атрофической форме ВМД [27]. Также у 10–20% этих крыс развивается неоваскуляризация. Ретинопатия проявляется в виде постепенного уменьшения толщины слоя ПЭС, слоя ФР, нарушения хориоидальной микроциркуляции, накопления амилоида и липофусцина в ПЭС. Накопление амилоида β — обнаруженное в мозге и определяющее особенность болезни Альцгеймера — также может определяться в сетчатке и при ВМД. Длительное лечение митохондриально-направленным антиоксидантом SkQ1 ежедневно в возрасте от 1,5 до 22-х мес. подавляло развитие ВМД-подобной патологии у крыс OXYS путем снижения уровня амилоида β и подавления активности *mTOR* в сетчатке [35]. Болезнь Альцгеймера также сопровождается накоплением белка Tau, в норме связывающего микротрубочки и способствующего стабильности цитоскелета нейронов. Мутация *Tau P301L* является причиной агрегации белков Tau, что приводит к потере нейронов в мозге [23]. У трансгенных мышей *Tau P301L* по сравнению с контрольными мышами было обнаружено значительное уменьшение толщины внутреннего ядерного слоя сетчатки. Эффект был более выраженным в периферической области и усиливался с возрастом. Кроме того, ганглиозные клетки сетчатки (ГКС) мышей *Tau P301L* увеличивались в размерах с возрастом, а ГКС контрольных мышей — уменьшались [23].

Болезнь Штаргардта

Мыши, несущие нулевую мутацию в *ABCA4*, служат моделью аутосомно-рецессивного типа дистрофии Штаргардта

STGD1, хотя и имеют существенные ограничения в виде отсутствия у мышей макулы (первичная область, поражаемая при STGD1), более позднего начала и более медленной скорости дегенерации сетчатки, чем у пациентов [45]. У мышей с нокаутированным геном *ABCA4* и у пациентов с болезнью Штаргардта STGD1 потеря функции *ABCA4* вызывает накопление липофусцина в пигментном эпителии сетчатки и дегенерацию ФР, что приводит к слепоте. Белок ABCA4 является флиппазой в ФР, опосредующей удаление ретинолдегида, токсичного продукта фототрансдукции [45]. Недавно были обнаружены собаки с нефункциональным белком ABCA4 [33]. Обнаружение гомозиготной мутации с потерей функции ABCA4 у собак может способствовать развитию модели крупного животного для болезни Штаргардта у человека.

Аутосомно-доминантный тип болезни Штаргардта STGD3 вызывается мутацией в гене *ELOVL4*. У мышей мутантных по гену *ELOVL4* обнаруживается накопление непереваренных фагосом и липофусцина в ПЭС, за которым следовала атрофия клеток [26]. Впоследствии дегенерация ФР происходит в центральной части сетчатки, что напоминает развитие человеческой болезни Штаргардта, макулярной дистрофии или ВМД. *ELOVL4* трансгенные мыши могут быть моделью и для дистрофии Штаргардта, и для сухой формы ВМД [26].

Болезнь Беста

Для получения модели вителлиформной макулярной дистрофии Беста были созданы мыши, несущие мутацию W93C в гене *Best1* [50]. Оба варианта — *Best1^{wt/W93C}* и *Best1^{W93C/W93C}* — имели нормальные а- и b- волны на электроретинограмме, которые наблюдаются при болезни Беста. Морфологические исследования показали у мышей с 6-мес. возраста отложения, заполненные жидкостью и гранулами. С 18-мес. до 24-мес. возраста мыши *Best1^{wt/W93C}*

и *Best1^{W93C/W93C}* проявляли повышенное накопление липофусцина в пигментном эпителии сетчатки и значительное отложение нефагоцитированных наружных сегментов фоторецепторов и гранул липофусцина в субретиальном пространстве [50].

Индукцированные модели дегенерации сетчатки

Химически индуцированные модели получают путем токсического поражения сетчатки при инъекции химических соединений внутривенно, субретиально или в полость стекловидного тела глаза животных [5]. Более полувека назад было замечено ретинотоксическое действие йодата натрия и моноиодацетата натрия [38]. Так, внутривенное введение моноиодацетата натрия приводило к дегенерации клеток сетчатки и ПЭС, что проявляется и при ПР [38].

Интравитреальный способ введения йодата натрия кроликам для получения модели дегенерации сетчатки приводит только к локальному поражению сетчатки, а использование витреэктомии в дополнение к инъекции помогает получить диффузное поражение [9]. Йодат натрия токсичен для ПЭС и оказывает вторичное воздействие на ФР и хориокапилляры [9]. Введение в стекловидное тело N-метил-N-нитрозомочевины для получения модели ПР вызывает дозозависимый окислительный стресс, приводящий к апоптозу ФР [42]. Внутривенное введение этого вещества вызывает появление новообразований в мозге и др. побочные эффекты, которые предотвращаются при моделировании дегенерации сетчатки введением в стекловидное тело [42]. Хлорид кобальта (CoCl_2) используется в *in vivo* и *in vitro* исследованиях для имитирования гипоксии. Введение в стекловидное тело этого вещества вызывает гистологические изменения в сетчатке, схожие с изменениями в сетчатке модельных мышей rd [37].

Интравитреальное введение аденозинтрифосфата (АТФ) у грызунов и кошек вызывает гибель ФР [10]. Гибель клеток и дегенерация сетчатки наблюдалась в наружной сетчатке через 30 ч и через 12 недель после односторонней инъекции АТФ. Ганглиозные клетки, по-видимому, остаются относительно интактными, хотя пролиферация радиальных клеток Мюллера (глиоз) выявляется во всей сетчатке. Эти данные указывают на то, что возможно использование интравитреальной инъекции АТФ для получения модели дегенерации наружных слоев сетчатки [10]. Субретинальное введение полиэтиленгликоля вызывало у мышей морфологические изменения и активацию генов, обнаруживаемых при сухой форме ВМД у людей [31]. Модель дегенерации сетчатки также может быть получена введением в стекловидное тело избыточного количества агонистов ионотропных глутаматных рецепторов: каиновой кислоты или N-метил-D-аспартата [37, 46]. Так, однократное введение в стекловидное тело N-метил-D-аспартата может вызвать уменьшение количества ганглиозных клеток и толщины внутреннего плексиформного слоя [46]. Обращает на себя внимание способ получения дегенерации внутренней сетчатки при введении ингибиторов протеасом, после которого наблюдается гибель ганглиозных клеток сетчатки и сохранение клеток наружной части сетчатки. Такая модель дегенерации внутренней части сетчатки может быть полезна при исследовании глаукомы или диабетической ретинопатии с характерными изменениями сетчатки [25].

Физически индуцированные модели дегенерации сетчатки получают различными способами: световым повреждением, разрушением зрительного нерва, пережатием вен сетчатки, повышением давления в камере глаза, помещением в чередующиеся гипоксические и гипероксические камеры. Одной из распространенных животных мо-

делей исследования гибели ганглиозных клеток сетчатки является разрушение зрительного нерва, вызывающее апоптоз ганглиозных клеток [37].

Светоиндуцированное повреждение сетчатки — известная *in vivo* модель дегенерации сетчатки, которая имитирует большинство основных черт человеческой ВМД и широко используется для исследования механизмов дисфункции сетчатки [37]. С использованием такой модели дегенерации сетчатки была выявлена активация апоптотических путей и дегенерация как ФР, так и клеток ПЭС при ВМД [41]. И светоиндуцированная дегенерация сетчатки, и ВМД прогрессируют, по крайней мере, на поздних стадиях из-за неадекватной нейтрализации окислителей и свободных радикалов, которая может сопровождаться воспалительным компонентом [41]. При получении светоиндуцированных моделей обычно используют либо длительное воздействие света умеренной интенсивности, либо кратковременное воздействие света высокой интенсивности. Так, например, дегенерацию у крыс вызывали воздействием белого флюоресцентного света интенсивностью 5000 люкс в течение 5 ч [41]; у мышей — зеленого флюоресцентного света интенсивностью 3500 люкс в течение 3 ч [49] и белого флюоресцентного света интенсивностью 15000 люкс в течение 2-х ч [21]; у пигментированных кроликов — белого флюоресцентного света интенсивностью 18000 люкс в течение 2-х ч [47].

Разные породы мышей могут различаться по чувствительности к постоянному световому воздействию. Так, высокочувствительными является большинство мышей-альбиносов [28]. У пигментированных животных после длительного воздействия света не обнаруживаются какие-либо морфологические изменения, в то время как у альбиносов развивается дегенерация сетчатки. Интересным является тот факт, что воздействие света может дополнитель-

но усиливать дегенеративные процессы в сетчатке как у химически-индуцированных моделей, так и у генетических моделей [29, 40, 41, 48].

Ишемия сетчатки является распространенной причиной нарушения зрения и слепоты при различных заболеваниях сетчатки, таких как диабетическая ретинопатия и окклюзия вен сетчатки. Для создания модели ишемии анестезированную крысу оперируют и перевязывают нейлоновой нитью вокруг зрительного нерва до полного прекращения кровоснабжения сетчатки на 60 мин [34]. Также для получения модели ишемии сетчатки в камеру глаза анестезированной крысы вводят иглу, подключенную к сосуду с солевым р-ром, что позволяет повысить давление в камере глаза более чем на 110 мм рт. ст. [15]. Другие исследователи [20] вводили вместо солевого р-ра воздух и повышали давление до 150-ти мм рт. ст.

Одной из ведущих причин детской инвалидности по зрению является ретинопатия недоношенных [2]. При моделировании этой патологии используют в основном крыс, т.к. сетчатка новорожденных крысят при рождении незрелая и соответствуют таковой 24–26-недельного человеческого плода [17]. Для исследования ретинопатии недоношенных была предложена следующая экспериментальная модель: новорожденных крысят помещают на 14 сут в инкубатор, в котором концентрация кислорода колеблется между 60% и 15% каждые 12 ч [2].

Заключение

Таким образом, существует множество экспериментальных моделей животных с дегенерацией сетчатки, которых можно использовать при разработке консервативных и оперативных методов лечения дегенеративных заболеваний сетчатки человека. И если раньше генетически модифицированные модели дегенерации сетчатки были ограничены в большинстве случаев мышинными моделями, то разви-

тие генной инженерии дало возможность использования более крупных и удобных моделей. Представленные модели дегенерации сетчатки имеют свои преимущества и недостатки. Преимуществом индуцированных моделей дегенерации сетчатки является возможность поражения одного глаза и сохранения другого глаза в качестве контрольного [9]. Светоиндуцированная дегенерация представляет возможность контролировать время и интенсивность воздействия для получения необходимой степени дегенерации [29]. Фоторецепторы при светоиндуцированной дегенерации погибают от апоптоза, сходного с наблюдаемым в фоторецепторах людей с ПР и ВМД, кроме того, свет является важным кофактором в развитии этих заболеваний [29, 41]. Признаки светоиндуцированных дегенеративных процессов обычно обнаруживаются в сетчатке в центральной части сетчатки, в то время как дегенерации, вызванные химическим воздействием, бывают распространены диффузно по всей сетчатке [48]. С другой стороны, химически индуцированные дегенерации сопровождаются общим ухудшением состояния животного, его интоксикацией [9, 42].

Генетические модели, в свою очередь, требуют значительных усилий для их разработки, а также могут иметь более высокую стоимость и больший период времени до полного проявления заболевания [9, 42]. Однако имеются разные генетические линии, различающиеся по скорости дегенерации. Кроме того, интенсивность проявления дегенерации сетчатки различается у разных животных [29]. Стоит также отметить то, что ряд нейропротекторных веществ, эффективных при терапии на светоиндуцированных моделях, оказались неэффективны на некоторых спонтанных и генетически модифицированных моделях [29].

Светоиндуцированные модели выделяются неинвазивностью метода получения и, таким образом, меньшей вероятностью

осложнений по сравнению с моделями, получаемыми физическим воздействием иного рода или введением химических веществ. В спонтанных и генетически модифицированных моделях обычно наблюдается длительная дегенерация небольшого числа клеток сетчатки в определенный момент времени, тогда как в индуцированных моделях возможен контроль интенсивности и срока получения дегенерации. К тому же генетические модели также подвержены влиянию условий, которые могут ускорить или замедлить скорость дегенерации, что также необходимо учитывать. Индуцированные модели не могут полностью воспроизвести пути дегенерации сетчатки, вызванные, например, мутацией в каком-то одном гене, однако позволяют выявить общие пути дегенерации или защитные механизмы клеток. Стоит также отметить, что на сегодняшний день даже генетически модифицированные модели не могут адекватно воспроизвести такие полигенные болезни, как ВМД, глаукома или диабетическая ретинопатия.

Так, выбор экспериментальной модели дегенерации сетчатки разумно обосновывать на целях исследования и механизмах дегенерации сетчатки. И если для первоначальных исследований нейропротекторных свойств препаратов предпочтительно выбирать широко используемые модели с известными сроками дегенерации, морфофункциональными особенностями, то в остальных случаях нужно учитывать также и различные механизмы дегенерации, и молекулярные процессы, стоящие за ними. На разных этапах дегенерации сетчатки могут быть вовлечены такие процессы, как апоптоз нейронов, некроптоз, неоваскуляризация, гипероксия вследствие истончения ядерных слоев, окислительный стресс, стресс эндоплазматического рети-

кулула, изменения экспрессии белков аутофагии, активация микроглии [29], глиоз клеток Мюллера и астроцитов и др. [15].

Предварительные данные об эффективности и безопасности методов, получаемых на животных моделях, неоценимы для клинических исследований [13]. Так, было установлено, что аденоассоциированный вирус является безопасным и эффективным вирусным вектором для доставки генов в сетчатку, и до сих пор это единственный вирусный вектор, который показал положительные результаты при лечении наследственных заболеваний сетчатки [44]. Использование биоматериалов Аллоплант® при ВМД для стимуляции регенерации в хориоиде и сетчатке замедляет процессы дегенерации сетчатки [3]. Отдельные успехи показывает клеточная терапия: имплантация пигментных клеток сетчатки, полученных из эмбриональных стволовых клеток человека, улучшила зрение у половины пациентов, при этом побочные эффекты почти не наблюдались [43].

Области экспериментальной терапии постепенно расширяются: нейропротекторная терапия с непосредственным применением различных факторов, способствующих выживанию; использование наночастиц, действующих как антиоксиданты, и био-разлагаемых микросфер как невирусных векторов для доставки лекарств, генов и трофических факторов; разработка зрительных протезов с использованием технологии кремниевых чипов; область оптогенетики и др. [10, 14, 29]. Внушительное количество представленных животных моделей дает возможности широкого выбора для проведения фундаментальных исследований, раскрывающих патогенетические механизмы дегенеративных заболеваний сетчатки и поиска новых лечебных мероприятий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Байгильдин С.С., Мусина Л.А., Хисматуллина З.Р. Строение сетчатки глаза крыс линии WAG/Rij в раннем постнатальном онтогенезе. *Морфология*. 2018;153(3):29. [Baygildin S.S., Musina L.A., Khismatullina Z.R. Stroenie setchatki glaza kryslinii WAG/Rij v rannem postnatalnom ontogeneze [The eye retinal structure of WAG/Rij rats in the early postnatal ontogenesis]. *Morphology*. 2018;153(3):29. (In Russian)].
2. Катаргина Л.А., Хорошилова-Маслова И.П., Майбогин А.М., Панова И.Г., Осипова Н.А. Патоморфологические особенности развития экспериментальной ретинопатии недоношенных. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2017;(3–2):190–194. [Katargina L.A., Horoshilova-Maslova I.P., Maybogin A.M., Panova I.G., Osipova N.A. Patomorfologicheskie osobennosti razvitiya eksperimentalnoy retinopatii nedonoshennyh [Pathomorphological features of the development of experimental retinopathy of prematurity]. *Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnyh i fundamentalnyh issledovaniy* [International J. of Applied and Basic Research]. 2017;3–2:190–194. (In Russian)].
3. Кийко Ю.И. Сенильная макулярная дегенерация: Регенеративная хирургия биоматериалами аллоплант. Уфа: Здравоохранение Башкортостана. 2002:151. [Kiyko Yu.I. Senilnaya makulyarnaya degeneratsiya Regenerativnaya hirurgiya biomaterialami alloplant [Age-related macular degeneration: Regenerative surgery with alloplant biomaterials]. Ufa: Zdravookhranenie Bashkortostana Publ. 2002:151. (In Russian)].
4. Колоскова Е.М., Каркищенко В.Н., Езерский В.А., Петрова Н.В., Максименко С.В., Матвейенко Е.Л. Трансгенные и нокаутные кролики в биомедицине и генотерапии. CRISPR/CAS9-технологии (обзор). *Биомедицина*. 2019;4:12–33. [Koloskova E.M., Karkischenko V.N., Yezersky V.A., Petrova N.V., Maksimenko S.V., Matveyenko E.L. Transgennyye i nokautnyye kroliki v biomeditsine i genoterapii CRISPR/Cas9 tekhnologii (obzor) [Rabbit Biomodels of Human Diseases Developed Using New Genomic Technologies]. *Journal Biomed*. 2019;15(4):12–33. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-15-4-12-33.
5. Милошина Л.А., Кузнецова А.В., Александрова М.А. Экспериментальные модели дегенеративно-дистрофических заболеваний сетчатки человека: индуцированные модели. *Вестник офтальмологии*. 2013;3:94–97. [Milyushina L.A., Kuznetsova A.V., Aleksandrova M.A. Eksperimentalnyye modeli degenerativno-distroficheskikh zabolevaniy setchatki cheloveka: indutsirovannyye modeli [Experimental models of human retinal degenerations: induced models]. *Ophthalmology bulletin*. 2013;3:94–97. (In Russian)].
6. Мусина Л.А., Балхиева Л.Х., Хисматуллина З.Р., Табанаква Т.М. Экспериментальная модель пигментной дегенерации сетчатки глаза. *Вестник ОГУ*. 2012;12:140–143. [Musina L.A., Balhieva L.Kh., Khismatullina Z.R., Tabanakova T.M. Eksperimentalnaya model pigmentnoy degeneratsii setchatki glaza [The experimental model of the eye retinal pigmental degeneration]. *Vestnik of the Orenburg State University*. 2012;12:140–143. (In Russian)].
7. Acland G.M., Aguirre G.D., Ray J., Zhang Q., Aleman T.S., Cideciyan A.V., et al. Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. *Nat. Genet*. 2001;28(1):92–95. DOI:10.1038/ng0501-92.
8. Agurtzane Rivas M., Vecino E. Animal models and different therapies for treatment of retinitis pigmentosa. *Histol Histopathol*. 2009;24(10):1295–1322. DOI: 10.14670/HH-24.1295.
9. Ahn S.M., Ahn J., Cha S., Yun C., Park T.K., Kim Y.J., et al. The effects of intravitreal sodium iodate injection on retinal degeneration following vitrectomy in rabbits. *Sci. Rep*. 2019;9(1):1–10. DOI: 10.1038/s41598-019-52172-y.
10. Aplin F.P., Vessey K.A., Luu C.D., Guymer R.H., Shepherd R.K., Fletcher E.L. Retinal changes in an ATP-induced model of retinal degeneration. *Front. Neuroanat*. 2016;10:46. DOI: 10.3389/fnana.2016.00046.
11. Bainbridge J.W., Mehat M.S., Sundaram V., Robbie S.J., Barker S.E., Ripamonti C., et al. Long-term effect of gene therapy on Leber's congenital amaurosis. *N. Engl. J. Med*. 2015;372(20):1887–1897. DOI: 10.1056/NEJMoa1414221.
12. Bujakowska K.M., Fernandez-Godino R., Place E., Consugar M., Navarro-Gomez D., White J., et al. Copy-number variation is an important contributor to the genetic causality of inherited retinal degenerations. *Genet. Med*. 2017;19(6):643–651. DOI: 10.1038/gim.2016.158.
13. Chung C.Y., Chung C.Y. Animal Models of Retinal Degeneration. *J. Ophthalmic Res. Ocular Care*. 2017;1(1). DOI: 10.36959/936/562.
14. Cuenca N., Fernández-Sánchez L., Campello L., Maneu V., De la Villa P., et al. Cellular responses following retinal injuries and therapeutic approaches for neurodegenerative diseases. *Prog. Retin. Eye Res*. 2014;43:17–75. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2014.07.001.
15. Di Pierdomenico J., García-Ayuso D., Pinilla I., Cuenca N., Vidal-Sanz M., et al. Early events in retinal degeneration caused by rhodopsin mutation or pigment epithelium malfunction: differences and similarities. *Front. Neuroanat*. 2017;11:14. DOI: 10.3389/fnana.2017.00014.
16. Donello J.E., Padillo E.U., Webster M.L., Wheeler L.A., Gil D.W. α 2-Adrenoceptor agonists inhibit vitreal glutamate and aspartate accumulation

- and preserve retinal function after transient ischemia. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2001;296(1):216–223. PubMed: 11123383.
17. Dorfman A.L., Joly S., Hardy P., Chemtob S., Lachapelle P. The effect of oxygen and light on the structure and function of the neonatal rat retina. *Doc. Ophthalmol.* 2009;118(1):37–54. DOI: 10.1007/s10633-008-9128-7.
 18. Espinosa-Heidmann D.G., Sall J., Hernandez E.P., Cousins S.W. Basal laminar deposit formation in APO B100 transgenic mice: complex interactions between dietary fat, blue light, and vitamin E. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2004;45(1):260–266. DOI: 10.1167/iov.03-0910.
 19. Fletcher E.L., Jobling A.I., Greferath U., Mills S.A., Waugh M., Ho T., et al. Studying age-related macular degeneration using animal models. *Optom. Vis. Sci.* 2014;91(8):878. DOI: 10.1097/OPX.0000000000000322.
 20. Fontaine V., Mohand-Said S., Hanoteau N., Fuchs C., Pfizenmaier K., Eisel U. Neurodegenerative and neuroprotective effects of tumor necrosis factor (TNF) in retinal ischemia: opposite roles of TNF receptor 1 and TNF receptor 2. *J. Neurosci.* 2002;22(7):RC216. DOI: 20026253.
 21. Grimm C., Wenzel A., Hafezi F., Yu S., Redmond T.M., Remé C.E. Protection of Rpe65-deficient mice identifies rhodopsin as a mediator of light-induced retinal degeneration. *Nat. Genet.* 2000;25(1):63–66. DOI: 10.1038/75614.
 22. Haider N.B., Naggert J., Nishina P.M. Excess cone cell proliferation due to lack of a functional NR2E3 causes retinal dysplasia and degeneration in rd7/rd7 mice. *Hum. Mol. Genet.* 2001;10(16):1619–1626. DOI: 10.1093/hmg/10.16.1619.
 23. Ho W.L., Leung Y., Cheng S.S., Lok C.K., Ho Y.S., Baum L., et al. Investigating degeneration of the retina in young and aged tau P301L mice. *Life Sci.* 2015;124:16–23. DOI: 10.1016/j.lfs.2014.12.019.
 24. <https://sph.uth.edu/RetNet/>
 25. Kageyama M., Ota T., Sasaoka M., Katsuta O., Shinomiya K. Chemical proteasome inhibition as a novel animal model of inner retinal degeneration in rats. *PLoS One.* 2019;14(5): e0217945. DOI: 10.1371/journal.pone.0217945.
 26. Karan G., Lillo C., Yang Z., Cameron D.J., Locke K.G., Zhao Y., et al. Lipofuscin accumulation, abnormal electrophysiology, and photoreceptor degeneration in mutant ELOVL4 transgenic mice: a model for macular degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005;102(11):4164–4169. DOI: 10.1073/pnas.0407698102.
 27. Kozhevnikova O.S., Telegina D.V., Devyatkin V.A., Kolosova N.G. Involvement of the autophagic pathway in the progression of AMD-like retinopathy in senescence-accelerated OXYS rats. *Biogerontology.* 2018;19(3–4):223–235. DOI: 10.1007/s10522-018-9751-y.
 28. LaVail M.M., Gorrin G.M., Repaci M.A. Strain differences in sensitivity to light-induced photoreceptor degeneration in albino mice. *Curr. Eye Res.* 1987;6(6):825–834. DOI: 10.3109/02713688709034850.
 29. LaVail M.M., Nishikawa S., Steinberg R.H., Naash M.I., Duncan J.L., Trautmann N., et al. Phenotypic characterization of P23H and S334ter rhodopsin transgenic rat models of inherited retinal degeneration. *Exp. Eye Res.* 2018;167:56–90. DOI: 10.1016/j.exer.2017.10.023.
 30. Leinonen H., Keksa-Goldsteine V., Ragauskas S., Kohlmann P., Singh Y., et al. Retinal degeneration in a mouse model of CLN5 disease is associated with compromised autophagy. *Sci. Rep.* 2017;7:1597. DOI: 10.1038/s41598-017-01716-1.
 31. Lyzogubov V.V., Bora N.S., Bora P.S. Polyethylene Glycol (PEG) Induced Mouse Model of Dry Age Related Macular Degeneration (AMD). *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2014;55(13):1181. DOI: 10.1016/j.exer.2014.07.021.
 32. Maguire A.M., Simonelli F., Pierce E.A., Pugh Jr E.N., Mingozzi F., Bencicelli J., et al. Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N. Engl. J. Med.* 2008;358(21):2240–2248. DOI: 10.1056/NEJMoa0802315.
 33. Mäkeläinen S., Gödia M., Hellsand M., Viluma A., Hahn D., Makdoui K., et al. An ABCA4 loss-of-function mutation causes a canine form of Stargardt disease. *PLoS Genet.* 2019;15(3):e1007873. DOI: 10.1371/journal.pgen.1007873.
 34. Miyake T., Nishiwaki A., Yasukawa T., Ugawa S., Shimada S., Ogura Y. Possible implications of acid-sensing ion channels in ischemia-induced retinal injury in rats. *Jpn. J. Ophthalmol.* 2013;57(1):120–125. DOI: 10.1007/s10384-012-0213-9.
 35. Muraleva N.A., Kozhevnikova O.S., Fursova A.Z., Kolosova N.G. Suppression of AMD-Like Pathology by Mitochondria-Targeted Antioxidant SkQ1 Is Associated with a Decrease in the Accumulation of Amyloid β and in mTOR Activity. *Antioxidants (Basel).* 2019;8(6):177. DOI: 10.3390/antiox8060177.
 36. Nishimura D.Y., Fath M., Mullins R.F., Searby C., Andrews M., Davis R., et al. Bbs2-null mice have neurosensory deficits, a defect in social dominance, and retinopathy associated with mislocalization of rhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004;101(47):16588–16593. DOI: 10.1073/pnas.0405496101.
 37. Niwa M., Aoki H., Hirata A., Tomita H., Green P.G., Hara A. Retinal cell degeneration in animal models. *Int. J. Mol. Sci.* 2016;17(1):110. DOI: 10.3390/ijms17010110.
 38. Noell W.K. Experimentally induced toxic effects on structure and function of visual cells and pigment epithelium. *Am. J. Ophthalmol.* 1953;36(6):103–116. DOI: 10.1016/0002-9394(53)90159-7.
 39. Ofri R., Reilly C.M., Maggs D.J., Fitzgerald P.G., Shilo-Benjamini Y., Good K.L., et al. Characterization of an early-onset, autosomal recessive, progressive

- retinal degeneration in Bengal cats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2015;56(9):5299–5308. DOI: 10.1167/iov.15-16585.
40. O'steen W.K., Donnelly J.E. Chronologic analysis of variations in retinal damage in two strains of rats after short-term illumination. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1982;22(2):252–255. PMID: 7056638.
41. Rezaie T., McKercher S.R., Kosaka K., Seki M., Wheeler L., Viswanath V., et al. Protective effect of carnosic acid, a pro-electrophilic compound, in models of oxidative stress and light-induced retinal degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2012;53(12):7847–7854. DOI: 10.1167/iov.12-10793.
42. Rösch S., Johnen S., Mataruga A., Müller F., Pfarrer C., Walter P. Selective photoreceptor degeneration by intravitreal injection of N-methyl-N-nitrosourea. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2014;55(3):1711–1723. DOI: 10.1167/iov.13-13242.
43. Schwartz S.D., Tan G., Hosseini H., Nagiel A. Subretinal transplantation of embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium for the treatment of macular degeneration: an assessment at 4 years. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2016;57(5):ORSFc1–9. DOI: 10.1167/iov.15-18681.
44. Takahashi V.K., Takiuti J.T., Jauregui R., Tsang S.H. Gene therapy in inherited retinal degenerative diseases, a review. *Ophthalmic Genet.* 2018;39(5):560–568. DOI: 10.1080/13816810.2018.1495745.
45. Tanna P., Strauss R.W., Fujinami K., Michaelides M. Stargardt disease: clinical features, molecular genetics, animal models and therapeutic options. *Br. J. Ophthalmol.* 2017;101(1):25–30. DOI: 10.1136/bjophthalmol-2016-308823.
46. Ueda K., Nakahara T., Mori A., Sakamoto K., Ishii K. Protective effects of TGF- β inhibitors in a rat model of NMDA-induced retinal degeneration. *Eur. J. Pharmacol.* 2013;699(1–3):188–193. DOI: 10.1016/j.ejphar.2012.11.054.
47. Wang Y., Zhao L., Lu F., Yang X., Deng Q., Ji B., et al. Retinoprotective effects of bilberry anthocyanins via antioxidant, anti-inflammatory, and anti-apoptotic mechanisms in a visible light-induced retinal degeneration model in pigmented rabbits. *Molecules.* 2015;20(12):22395–22410. DOI: 10.3390/molecules201219785.
48. Yamashita H., Hoenerhoff M.J., Peddada S.D., Sills R.C., Pandiri A.R. Chemical exacerbation of light-induced retinal degeneration in F344/n rats in National Toxicology Program rodent bioassays. *Toxicol. Pathol.* 2016;44(6):892–903. DOI: 10.1177/0192623316650050.
49. Zhang C., Lei B., Lam T.T., Yang F., Sinha D., Tso M.O. Neuroprotection of photoreceptors by minocycline in light-induced retinal degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2004;45(8):2753–2759. DOI: 10.1167/iov.03-1344.
50. Zhang Y., Stanton J.B., Wu J., Yu K., Hartzell H.C., Peachey N.S., et al. A.D. Suppression of Ca²⁺ signaling in a mouse model of Best disease. *Hum. Mol. Genet.* 2010;19(6):1108–1118. DOI: 10.1093/hmg/ddp583.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Байгильдин Самат Сагадатович*, ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека»; ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет»;
e-mail: baigildin.samat@yandex.ru

Мусина Ляля Ахияровна, д.б.н., ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии» Минздрава России;
e-mail: morphoplant@mail.ru

Хисматуллина Зухра Рашидовна, д.б.н., проф., ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет»;
e-mail: hismatullinazr@mail.ru

Samat S. Baygildin*, Ufa Research Institute of Occupational Health and Human Ecology, Bashkir State University;
e-mail: baigildin.samat@yandex.ru

Lyalya A. Musina, Dr. Sci. (Biol.), Russian Eye and Plastic Surgery Center of the Ministry of Health care of Russia;
e-mail: morphoplant@mail.ru

Zukhra R. Khismatullina, Dr. Sci. (Biol.), Prof., Bashkir State University;
e-mail: hismatullinazr@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ ХРОНИЧЕСКОГО ВОСПАЛЕНИЯ, ИНДУЦИРОВАННОГО ФОРМАЛИНОМ, НА РАЗВИТИЕ ОПУХОЛИ И ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЖИЗНИ БЕЛЫХ БЕСПОРОДНЫХ КРЫС

Г.В. Жукова*, А.И. Шихлярова, Т.П. Протасова, Е.А. Лукбанова, Е.В. Заикина, А.В. Волкова, Д.В. Ходакова

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России
344037, Российская Федерация, Ростов-на-Дону, 14-я линия, 63

Целью работы стало изучение влияния хронического воспаления, индуцированного формалином, на развитие злокачественных опухолей в зоне, удаленной от очага воспаления, и продолжительность жизни белых беспородных крыс-опухоленосителей.

Эксперименты проводили на 29-ти белых беспородных половозрелых крысах-самцах, разделенных на 3 группы: контрольную, группу с введением воды и основную группу с введением формалина. Водный раствор формалина или воду в том же объеме вводили в область левого голеностопного сустава трижды до трансплантации карциномы Герена через 4 недели после первого введения. Оценивали динамику размеров опухолей, продолжительность жизни животных, выраженность отека, содержание лейкоцитов в крови, общую двигательную активность (тест «Открытое поле»). При статистическом анализе использовали программный пакет «Statistica 6», а также тест Крускала—Уоллиса и критерий Данна.

Введение формалина ускоряло рост опухоли у большинства животных. Несмотря на это, в 50% случаев наблюдалось увеличение продолжительности жизни по сравнению с максимальным показателем в контрольной группе. Гибель таких животных часто наступала при более значительных размерах опухоли, чем у крыс контрольной группы. Выявлены особенности воспалительной реакции и динамики двигательной активности до формирования опухоли, характерные для животных, отличавшихся продолжительностью жизни. При введении воды отмечена сходная направленность изменений изученных показателей при меньшей выраженности воспалительной реакции и боли, чем при введении формалина. Обозначены возможные механизмы «устойчивости» организма к росту опухоли при развитии хронического воспаления.

Впервые показано разнонаправленное влияние воспаления, индуцированного формалином, на опухолевый процесс: ускорение роста опухоли у большинства белых беспородных крыс-самцов при одновременном повышении продолжительности жизни у части таких животных и единичных случаях торможения роста опухоли. Открыт вопрос о механизмах «устойчивости» к росту опухоли при развитии воспаления. Результаты представляют интерес в связи с актуальностью вопроса о влиянии на онкогенез воспалительных патологий костно-мышечной системы.

Ключевые слова: формалин, воспаление, злокачественные опухоли, продолжительность жизни, двигательная активность, хроническая боль

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: работа не спонсировалась, проведена при поддержке ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону.

Для цитирования: Жукова Г.В., Шихлярова А.И., Протасова Т.П., Лукбанова Е.А., Заикина Е.В., Волкова А.В., Ходакова Д.В. Особенности влияния хронического воспаления, индуцированного формалином, на развитие опухоли и продолжительность жизни белых беспородных крыс. *Биомедицина*. 2021;17(1):82–93. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-1-82-93>

Поступила 19.04.2020

Принята после доработки 21.12.2020

Опубликована 10.03.2021

IMPACT OF CHRONIC FORMALIN-INDUCED INFLAMMATION ON TUMOUR DEVELOPMENT AND LONGEVITY IN WHITE OUTBRED RATS

Galina V. Zhukova*, Alla I. Shikhlyarova, Tatiana P. Protasova, Ekaterina A. Lukbanova, Ekaterina V. Zaikina, Anastasiya V. Volkova, Darya V. Khodakova

National Medical Research Centre for Oncology of the Ministry of Health care of Russia
344037, Russian Federation, Rostov-on-Don, 14 Liniya Street, 63

The work aimed to investigate the impact of chronic formalin-induced inflammation on the remote malignancy development and longevity in white outbred tumour-bearing rats.

Experiments were conducted with 29 white outbred mature male rats divided in three groups: a control, water-injection and main formalin-injection group. Aqueous formaldehyde or same water volume were injected into left ankle joint thrice prior to Guerin's carcinoma transplantation, 4 weeks past the first injection. The tumour size dynamics, longevity, oedema severity, blood leucocyte count and overall motor activity were estimated with an Open Field test. Statistical analysis was performed with Statistica 6 using the Kruskal—Wallis and Dunn's test criteria.

Formalin administration accelerated the tumour growth in most animals. Nevertheless, longevity increased relative to the control's maximum in 50% cases. Lethality in such cases was often registered with larger tumours relative to the control group. The pre-tumour traits of inflammatory response and motor dynamics in longer-lived animals have been revealed. A similar trend was registered in water administration trials at a less pronounced inflammatory and algetic response relative to the formalin trials. Putative chronic inflammation-associated mechanisms of anti-tumour resistance have been proposed.

A multidirectional effect of formalin-induced inflammation on tumourigenesis is shown for the first time: a prevailing tumour growth acceleration at higher longevity with seldom tumour inhibition cases in white outbred male rats. The mechanisms of inflammation-associated anti-tumour resistance require further research. The results relate to the known effect of musculoskeletal inflammatory conditions on tumourigenesis.

Keywords: formalin, inflammation, malignant tumors, longevity, motor activity, chronic pain

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

Funding: the work had no sponsorship. It was carried out with the support of the National Medical Research Centre for Oncology of the Ministry of Health care of Russia, Rostov-on-Don.

For citation: Zhukova G.V., Shikhlyarova A.I., Protasova T.P., Lukbanova E.A., Zaikina E.V., Volkova A.V., Khodakova D.V. Impact of Chronic Formalin-Induced Inflammation on Tumour Development and Longevity in White Outbred Rats. *Journal Biomed.* 2021;17(1):82–93. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-1-82-93>

Submitted 19.04.2020

Revised 21.12.2020

Published 10.03.2021

Введение

Известно о влиянии воспалительного процесса на формирование «опухолевого поля», инициирующего злокачественный процесс [13]. Показана важная роль провоспалительных цитокинов в нарушении механизмов иммунного надзора, связанном с образованием пула опухолеассоциированных макрофагов вследствие изменения по-

ляризации этих клеток и проопухолевой перестройки их активности [3, 13]. Известно о снижении эффективности противоопухолевой химиотерапии и сокращении продолжительности жизни онкологических больных при воспалении, обусловленном самим опухолевым процессом [15]. В то же время недостаточно изучено влияние на злокачественный рост воспалительного процесса,

локализованного вне зоны развития новообразования, а также не связанного с опухолью системного воспаления, характерного для возрастных патологий костно-мышечной системы. Нуждается в выяснении вопрос о роли хронической боли как ведущего клинического проявления генерализованных воспалительных процессов в костно-мышечной системе (воспалительная боль) [16]. Только в последние годы появились сведения об изменении течения злокачественного процесса при развитии выраженной хронической боли нейрогенного происхождения [2]. Параллелизм возрастного увеличения частоты возникновения злокачественных опухолей и развития воспалительных процессов в костно-мышечной системе [6] определяет целесообразность исследования особенностей роста опухолей при формировании воспалительного синдрома.

Важный аспект рассматриваемой проблемы связан с индивидуальными особенностями регуляторных процессов различного уровня, которые могут модифицировать влияние эндогенных факторов на развитие опухоли у разных людей и животных [10, 17]. Это определяет целесообразность проведения ряда этапов исследований на беспородных животных, более близких к человеческой популяции по генетическому разнообразию и диапазону индивидуальных реакций по сравнению с линейными животными.

В литературе практически отсутствуют сведения об особенностях опухолевого роста и состояния животных-опухоленосителей при воспроизведении какой-либо модели воспалительного процесса и хронической воспалительной боли. Известно, что с помощью формалина, вводимого в разных режимах в апоневрозы или полость суставов конечностей лабораторных животных, можно получить экспериментальные модели острой и хронической воспалительной боли, воспалительного процесса, аналогичного артрит-

ту [4]. Так, в случае двукратной инъекции 2–5% р-ра формалина в объеме 0,1–0,2 мл с интервалом в 24 ч в суставной апоневроз задней конечности крыс или мышей последовательно возникают фазы острой и тонической боли, развивается выраженный отек конечности. Перечисленные события имеют динамику острого процесса и укладываются в интервал в 96 ч. По окончании указанного интервала в течение 4–4,5 недель происходит хронизация воспалительного процесса с формированием хронической боли и развитием структурных нарушений в зоне инъекций формалина, вплоть до необратимой деформации стоп и полной потери фаланг [4].

Целью исследования стало изучение влияния хронического воспаления, индуцированного формалином, на развитие перививных злокачественных опухолей в зоне, удаленной от очага воспаления, и продолжительность жизни белых беспородных крыс-опухоленосителей.

Материалы и методы

При проведении экспериментов соблюдали международные правила биоэтики. В эксперименте использовали 29 белых беспородных крыс-самцов массой 270–350 г, полученных из филиала «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России (Московская обл.). Возраст животных к началу эксперимента составлял 5–5,5 мес. В основную группу вошли 16 животных, получавших инъекции водного р-ра формалина. 7 самцов составили группу животных, которым вводили только воду в том же объеме и в те же сроки, что и р-р формалина в основной группе. Контрольная группа включала 6 крыс, не подвергавшихся дополнительным воздействиям, которым затем в те же сроки, что и животным остальных двух групп, трансплантировали опухоль. Крыс содержали в стандартных условиях вивария для конвенциональных животных.

За 4 недели до трансплантации опухоли крысам основной группы в область голеностопного сустава слева, дважды с интервалом в 48 ч, вводили 0,2 мл 2% водного р-ра формалина [4]. Для разведения формалина и контрольных инъекций использовали ампулированную воду. Третий раз введение повторяли через 4 недели, накануне перевивки опухоли. Выраженность отека определяли по толщине конечности, измеряемой штангенциркулем с цифровым отсчетным устройством ШЦЦ.01.001 ПС. Измерения проводили 4 раза в течение 10-ти дней после первого введения формалина или воды, начиная с первых суток, а также 4 раза в течение 10-ти дней после третьего введения, на начальном этапе формирования опухоли — всего 8 измерений. Для оценки выраженности отека вычисляли изменение толщины конечности (d) относительно значений показателя на предыдущем этапе — $\Delta\% = (d_n - d_{n-1}) / d_{n-1}$. Как известно, увеличение объема конечностей при пятидневном наблюдении после введения формалина приобретает устойчивый характер, и на 5–6 день наблюдается повторное увеличение размеров конечности («вторая волна») [4]. Для дополнительной оценки выраженности воспалительной реакции исходно, через 5–6 дней после первого введения формалина, перед третьим введением формалина (накануне трансплантации опухоли) и через 5–6 дней после него на гемоанализаторе «Exigo EOS vet» (Boule Medical, Швеция) определяли общее содержание лейкоцитов в крови. Забор крови осуществляли при ручной фиксации животного из подкожной вены, расположенной на медиальной поверхности бедра.

Для оценки состояния животных в стрессогенных условиях по двигательному компоненту эмоциональной реактивности применяли тест «Открытое поле», позволяющий определять общую двигательную активность животных, отражающую их типологические особенности и стрессо-

устойчивость [11]. Для этого использовали компьютеризированную установку «Открытое поле» TS0501 типа «ринг» (ООО «НПК Открытая наука», Московская обл.). Различные элементы двигательной активности фиксировали в течение 5-ти мин. Оценивали горизонтальную и вертикальную двигательную активность в целом, вычисляя показатель общей двигательной активности (ОДА) животных по формуле: $ОДА = ПКц + ПК2/3 + ПКп + Со + Сб/о$, где ПКц — число пересечений квадратов в центре; ПК2/3 — число пересечений квадратов во второй трети площади поля, ПКп — число пересечений квадратов на периферии, Со — число стоек с опорой на стену, Сб/о — число стоек без опоры на стену. При этом определяемые до начала эксперимента значения ОДА учитывали при распределении животных по группам для обеспечения межгруппового сходства в относительном числе крыс с «высокими», «умеренными» и «низкими» значениями показателя ОДА.

В качестве трансплантируемой опухоли использовали карциному Герена. Перевивку опухоли осуществляли по общепринятой методике [13]. Взвесь опухолевых клеток в физ. р-ре (1:2) в объеме 0,5 мл вводили в заднебоковую поверхность спины. В дальнейшем 2–3 раза в неделю оценивали динамику размеров опухолей, вычисляя их объем по формуле Шрека для эллипсоидов: $a \cdot b \cdot c \cdot \pi / 6$, где a, b и c — максимальные линейные размеры опухоли в трех взаимно перпендикулярных плоскостях. Для измерения линейных размеров опухоли так же, как и для определения толщины конечности, использовали штангенциркуль ШЦЦ.01.001 ПС. Продолжительность жизни (ПЖ) крыс определяли с момента трансплантации опухоли.

Эксперимент продолжался более 2,5 мес. — с первых инъекций формалина и воды до гибели последнего животного-опухоленосителя. При статистической

обработке полученных результатов использовали стандартный пакет программ «Statistica 6». Определяли характеристики распределения изученных показателей (размах, медиана, коэффициенты вариации, показатели асимметрии и эксцесса, χ^2 критерий согласия Пирсона), средние значения показателей с ошибкой среднего, доли (%). Использовали критерий Вилкоксона—Манна—Уитни, непараметрический тест Крускала—Уоллиса для трех групп с последующим попарным сравнением выборок с помощью критерия Данна [1]. Для связанных выборок использовали Z-критерий знаков. Статистически значимые отличия показателей, выраженных в процентах, от значений в контрольной группе выявляли с помощью варианта t-критерия для сравнения долей [5].

Результаты и их обсуждение

Как уже было отмечено, особенности воспалительной реакции и изменение показателя ОДА изучали до перевивки опухоли и на начальном этапе её формирования (10 дней). Исследование на более поздних этапах было менее информативным, поскольку закономерно возникала зависимость двигательной активности животных также и от размеров карциномы. Оценка показателя ОДА до начала эксперимента позволила выделить условные диапазоны «низкой» (15–30), «средней» (40–80) и «высокой» (90–110) двигательной активности, наличие которых учитывали при распределении животных по группам. При этом не менее половины крыс исследованных групп исходно демонстрировали «среднюю» ОДА. Так, в группе с введением формалина число таких особей составило 56% (9 из 16-ти). В целом количество животных с «высоким» и «низким» фоновым показателем ОДА было, соответственно, в 2 и 3,5 раза ниже, чем количество крыс со «средними» значениями данного показателя.

Введение 2% водного р-ра формалина и воды для инъекций, как правило, вызывало отек конечности в зоне введения. При анализе показателя $\Delta\%$, характеризовавшего изменение толщины конечности относительно предыдущего измерения, была определена область всех его значений, границами которой служили 2 и 90%. В пределах данной области были выделены 3 диапазона, условно соответствовавшие «слабой» (2–30%), «умеренной» (35–60%) и «выраженной» (65–90%) воспалительной реакции, отражавших степень изменения величины отека. Было отмечено, что при введении воды преобладала «слабая» реакция, отмеченная в 57% случаев, тогда как у животных, получавших формалин, «слабая» воспалительная реакция наблюдалась в 2,4 раза реже — только в 24% случаев ($p < 0,01$). Относительное число случаев развития «выраженной» реакции — 5 и 11% соответственно, при введении воды и формалина. Случаи развития «умеренной» реакции составили, соответственно, 38 и 64%. Таким образом, даже введение воды в 43% случаев приводило к «умеренной» и «выраженной» воспалительной реакции, оценивавшейся по нарастанию отека в зоне введения.

В отличие от крыс, получавших инъекции воды, у большинства животных основной группы с введением формалина через 3 недели после первых двух инъекций было отмечено значительное, в 2–6 раз, уменьшение показателя ОДА по сравнению с его исходными значениями (Z-критерий, $p < 0,05$; критерий Вилкоксона—Манна—Уитни, $p < 0,01$). При этом не наблюдалось заметной связи между степенью снижения значений ОДА и диапазоном, которому соответствовал показатель до начала эксперимента. Существенное преобладание межгруппового различия в изменении показателя ОДА над разницей между сравниваемыми группами по выраженности отека могло указывать на развитие хронической

Таблица 1. Объем карциномы Герена (см³) в разные сроки после трансплантации опухоли

Table 1. Guerin's carcinoma volume at various timepoints after tumour transplantation, cm³

Группы	2 недели	4 недели	5 недель
Контроль, n=6	19,0±3,1	61,1±5,4	87±8
Введение воды, n=7	19,6±4,1	86,2±11,0	123±1*
Введение формалина, n=16	25,5±2,3	89,0±10,0*	127±12*

Примечание: * — отличается от показателя в контрольной группе, $p < 0,05$, тест Крускала — Уоллиса, критерий Данна.

Note: * — significance vs. control group in Kruskal—Wallis and Dunn's tests, $p < 0.05$.

боли, усугубляющей негативное влияние формалина на состояние экспериментальных животных по сравнению с эффектами, производимыми введением воды.

В то же время результаты анализа динамики размеров опухоли, перевитой спустя 4 недели после начала эксперимента, свидетельствовали о сходном характере влияния инъекций формалина и воды, на развитие карциномы Герена (табл. 1).

Как видно из табл. 1, в течение первых двух недель после трансплантации не наблюдалось статистически значимых межгрупповых различий в объеме опухоли. Первые случаи гибели крыс во всех исследованных группах были отмечены уже через 3 недели после трансплантации карциномы Герена, также при отсутствии статистически значимых различий между группами по величине опухоли. Объемы опухоли накануне гибели первых животных составили 25,8 см³ в контрольной группе, 30,6 см³ — в группе с введением воды, 37,9 и 40,6 см³ — в группе с введением формалина. Через 4 недели после трансплантации карциномы Герена картина изменилась: средние размеры опухоли в группах с введением воды или формалина заметно (в 1,4 и 1,5 раза соответственно) превысили этот показатель в контрольной группе животных (табл. 1). Оценка межгрупповых различий с помощью теста Крускала—Уокера и критерия Данна выявила статистическую значимость отличий от значений в контрольной группе только для показателей животных, получавших формалин. После пятой недели со дня

трансплантации опухоли была заметна вполне четкая разница между контрольной и двумя другими группами ($p < 0,05$), свидетельствовавшая об ускорении темпов роста карциномы Герена под влиянием формалина и воды. При этом средние размеры опухоли у крыс двух указанных групп не различались (табл. 1). К рассматриваемому моменту относительное число павших животных в контрольной группе, группах с введением воды и формалина составило, соответственно, 50, 28 и 50%. Необходимо отметить единственный случай более медленного, чем в контрольной группе, роста опухоли у животного из группы крыс с введением формалина. Так, через 5 недель после трансплантации карциномы Герена объем опухоли у этого самца достиг значения 31,5 см³, тогда как минимальный показатель в контрольной группе на этом этапе был равен 78,7 см³. Таким образом, можно говорить о торможении роста опухоли не менее чем в 2,5 раза.

Итоговые показатели, отражающие особенности опухолевого роста у крыс исследованных групп, представлены в табл. 2. Результаты анализа объема опухоли накануне гибели животных разных групп свидетельствовали о неоднородности выборок (коэффициенты вариации — более 33%) и отличии распределения показателя в каждой из групп от нормального распределения (табл. 2). Как видно из табл. 2, введение воды и формалина вызывало неоднозначный эффект у исследованных животных. С одной стороны, в этих группах наблюдалось ускорение роста карци-

Таблица 2. Объем карциномы Герена и продолжительность жизни (ПЖ) у белых беспородных крыс-самцов накануне гибели**Table 2.** Guerin's carcinoma volume and longevity (ПЖ) prior to lethal outcome in white outbred male rats

Группы	Размах вариации (границы диапазона)	Объем опухоли, см ³			Количество животных с объемом опухоли более 100 см ³ (%)	ПЖ, сутки, границы диапазона
		Коэффициент вариации	$\bar{x} \pm m$	Медиана		
Контроль, n=6	91 (26–117)	43,8	71,0±15,0	77,5	1 (17)	20–38
Введение воды, n=7	138 (31–149)	43,5	93,0±18,0	84,0	3 (43*)	20–42
Введение формалина, n=16	169 (37–206)	44,8	113,0±13,0*	117,0	10 (62*)	20–49

Примечание: * — отличается от показателя в контрольной группе, $p < 0,01–0,05$, t -критерий (сравнение долей), критерий Вилкоксона—Манна—Уитни.

Note: * — significance vs. control group in independent two-sample t -test and Wilcoxon—Mann—Whitney test, $p < 0.01–0.05$.

номы Герена по сравнению с контрольной группой. В то же время крысы указанных групп демонстрировали заметно более широкий диапазон изменения размеров опухоли (размах вариации), чем в контроле, особенно в случае введения формалина (табл. 2). И гибель значительной части животных этих групп в итоге происходила при более крупных опухолях, чем в контрольной группе. Так, у крыс контрольной группы только в одном случае (17%) наблюдалась опухоль объемом свыше 100 см³ (117 см³), тогда как в группах с введением воды и формалина такие случаи составили, соответственно, 43% и 62%, статистически значимо превысив контрольный показатель (табл. 2). Особенно значительной эта разница была в случае введения формалина, в которой максимальный объем карциномы Герена накануне гибели составил 206 см³ (табл. 2). Таким образом, заметная часть особей, которым вводили формалин или воду, демонстрировала более высокую «устойчивость» к опухолям больших размеров по сравнению с крысами контрольной группы.

В отличие от объема карциномы Герена, показатель ПЖ подчинялся нормальному распределению, демонстрируя однородность выборки (коэффициент вариации

в контрольной группе, группах с введением воды и формалина, соответственно, 19, 21 и 25%) и практическое совпадение средних значений и медиан (32 и 33,5 сут — в контрольной группе, 35 и 38 сут — при введении воды, 35 и 35 сут — при введении формалина). Диапазоны вариации ПЖ особей, которым вводили формалин или воду, как и в случае объема опухоли накануне гибели животных, превышали диапазон контрольных значений данного показателя. Наиболее значительное отличие от контрольных показателей также было отмечено в группе с введением формалина, в которой размах вариации в 1,6 раза превышал этот показатель в контрольной группе (табл. 2). Парадоксальность ситуации заключалась в том, что некоторые животные, получавшие инъекции формалина или воды, имели более значительную ПЖ, чем крысы контрольной группы, максимальная ПЖ которых не превышала 38 сут (табл. 2). При введении формалина или воды относительное количество крыс с ПЖ более 38 сут было выше 40% (табл. 3). Интересно, что в группе с введением формалина их было не меньше, чем в группе с введением воды. При этом увеличение ПЖ одновременно с ускорением роста опухоли наблюдалось более чем у 60% таких крыс (табл. 3).

Таблица 3. Некоторые характеристики белых беспородных крыс-самцов с карциномой Герена, проживших более 38 сут

Table 3. Selected profile of white outbred male rats with Guerin's carcinoma and longevity more than 38 days

Группа	Отно- сительное число, %	ПЖ, сут	V накануне гибели, см ³		Особь с ускоренным ростом опухоли		
			границы диапазона	$\bar{x} \pm m$	Отно- сительное число, %	Внакануне гибели, см ³ границы диапазона	$\bar{x} \pm m$
Контроль, n=6	—	20–38	26–117	71±15,0	—		
Введение воды, n=7	3 (43%)	40–42	125–149	135±8,9*	2 (67%)	130–149	139±13,4*
Введение формалина, n=16	8 (50%)	40–49	99–194	136±11,6*	5 (62%)	118–194	151±13,8*

Примечание: V — объем опухоли, см³; ПЖ — продолжительность жизни; * — отличается от показателя в контрольной группе, $p < 0,05$, тест Крускала—Уоллиса, критерий Данна.

Note: V — tumour volume, cm³; ПЖ — longevity; * — significance vs. control group in Kruskal—Wallis and Dunn's tests, $p < 0.05$.

Максимальное значение ПЖ (49 сут) было отмечено в группе крыс, получавших формалин, — у единственного животного, отличавшегося торможением роста опухоли. При этом следующее по величине значение ПЖ (47 сут) было зафиксировано в этой же группе, у самца с ускоренным ростом карциномы Герена. У животных с повышенной ПЖ, получавших инъекции воды, максимальное значение показателя было ниже, чем у крыс из группы с введением формалина, — 42 сут. Таким образом, заметная часть особей, получавших формалин и воду, инициировавших воспалительную реакцию, действительно, демонстрировала более высокую «устойчивость» к опухолевому росту, чем крысы контрольной группы, не подвергавшиеся специальным повреждающим воздействиям (табл. 3). При этом показатели у животных, получавших формалин, в ряде случаев были даже лучше, чем у крыс, которым вводили воду. Закономерно возникает вопрос о механизмах такой «устойчивости» и ее возможной связи с особенностями воспалительной реакции, вызванной инъекциями формалина или воды. Очевидно, следует учитывать защитный характер воспалительной реакции, связанный с активизацией иммунных и нейрогуморальных регуляторных меха-

низмов, и её способность, в зависимости от конкретных условий, вызывать качественно различные изменения в организме [8, 9]. В связи с этим мы посчитали целесообразным, несмотря на ограниченный набор имеющихся показателей, полученных с помощью рутинных лабораторных методов, попытаться оценить наличие связи между ПЖ и особенностями воспалительной реакции путем сравнения доступных нам характеристик состояния животных, отличавшихся ПЖ.

Выраженная вариация значений ПЖ крыс, которым вводили формалин, позволила выделить три подгруппы, включавшие особей с различными значениями показателя: подгруппа 1 (ПЖ 20–29 дней, n=5), подгруппа 2 (ПЖ 30–38 дней, n=3) и подгруппа 3 (ПЖ 39–49 дней, n=8). Как уже было отмечено, у животных, которым вводили формалин, «слабая» воспалительная реакция, оценивавшаяся по изменению выраженности величины отека ($\Delta\%$), встречалась значительно реже, чем при введении воды. Представлял интерес вопрос о распределении данного показателя в основной группе в зависимости от ПЖ животных. Несмотря на малый размер выборок, была выявлена определенная разница между выделенными подгруппами по частоте такой реакции (рис.).

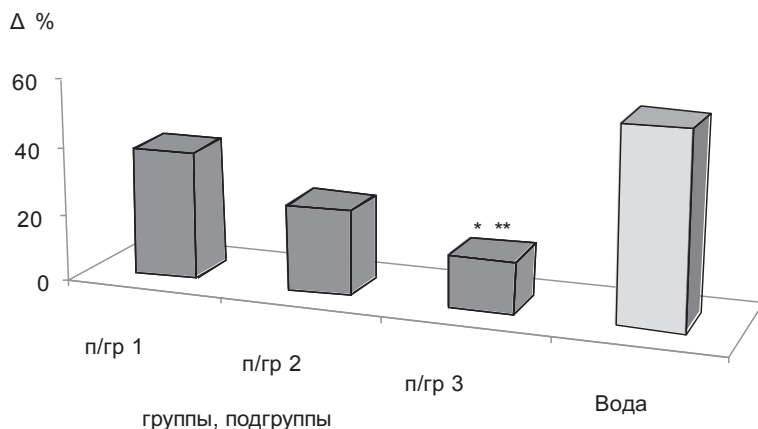


Рис. Частота «слабо выраженных» изменений величины отека конечности (Δ%) при введении формалина у белых беспородных крыс с разной продолжительностью жизни.

Примечание: n/gr — подгруппы животных, получавших инъекции воды («Вода»), $p < 0,01$; * — отличается от показателя в группе животных, получавших инъекции формалина, $p < 0,05$; ** — отличается от показателя в n/gr 1, $p < 0,05$, t -критерий (сравнение долей).

Fig. Rate of “minor” limb oedema changes in white outbred rats with variant longevity in formalin injection trials, Δ%.

Note: n/gr — formalin-injection subgroups; * — significance vs. water-injection group (“Water”), $p < 0.01$; ** — significance vs. n/gr 1 in independent two-sample t -test, $p < 0.05$.

Так, было показано, что частота «слабо выраженных» изменений отека конечности была минимальна в подгруппе 3 (15% случаев) и статистически значимо отличалась от показателей в подгруппе 1 (37,5%) и группе с введением воды (57%). В двух других подгруппах животных, получавших формалин (1 и 2), частота такой реакции статистически не отличалась от показателя при введении воды (рис.). При этом частота «выраженной» реакции в подгруппах 1–3 статистически не различалась и составляла, соответственно, 21, 14 и 14%. Таким образом, у крыс подгруппы 3 с наибольшей ПЖ преобладала «умеренная» воспалительная реакция (71% случаев). У животных подгруппы 2 отмечалось некоторое увеличение представленности других реакций, хотя сдвиг в сторону «умеренной» реакции все же сохранялся. У крыс подгруппы 1, отличавшихся минимальной ПЖ, наблюдался сдвиг рассматриваемого соотношения в сторону суммы случаев резко различных «слабой» и «выраженной» ре-

акций. Доминирование «умеренной» воспалительной реакции в подгруппе 3 могло отражать наиболее активное и, одновременно, сбалансированное состояние защитных механизмов у крыс с наиболее значительной ПЖ по сравнению с остальными животными основной группы.

Как известно, воспалительная реакция сопровождается лейкоцитозом. Была изучена направленность изменений уровня лейкоцитов в крови и показателя Δ%. До начала воздействий содержание лейкоцитов в крови животных варьировало в диапазоне $8\text{--}16,6 \times 10^9/\text{л}$. После инъекций в течение последующих 10-ти дней рассматриваемый показатель изменялся в диапазоне $12\text{--}25 \times 10^9/\text{л}$ — в случае введения формалина, и в интервале $10\text{--}22 \times 10^9/\text{л}$ — в случае введения воды, без статистически значимых межгрупповых и внутригрупповых различий. В то же время была выявлена разница между подгруппами 1 и 3 по частоте односторонних изменений уровня лейкоцитов в крови и показателя Δ%. Так, в подгруппе

3 относительные изменения размеров пораженной конечности имели ту же направленность, что и сдвиги уровня лейкоцитов в крови, тогда как у крыс подгруппы 1 относительное число односторонних изменений рассматриваемых показателей не превышало 20% (Z-критерий знаков, $p < 0,05$). По нашему мнению, выявленное отличие так же, как и доминирование «умеренной» воспалительной реакции, могло указывать на сбалансированное развитие регуляторных процессов как на характерный признак состояния крыс подгруппы 3.

Кроме того, при введении формалина у крыс разных подгрупп были отмечены особенности динамики двигательной активности в период до формирования опухоли. Так, в подгруппе 1 при исходно «средней» двигательной активности показатель ОДА снижался в 2–5 раз. Особенно резкое снижение показателя наблюдалось у одного животного с исходно «низкой» двигательной активностью: на 7-е сут после первого введения формалина значение ОДА уменьшилось до величины «1», а спустя еще 3 недели — до «0». Именно у этого животного в дальнейшем была отмечена минимальная ПЖ после трансплантации карциномы Герена. Обращало на себя внимание, что при значительном снижении двигательной активности в данной подгруппе изменение степени отека могло быть «выраженным», «умеренным» и «слабым». Вероятно, сдвиг показателя ОДА в этих случаях зависел также и от выраженности боли. В подгруппе 2 резкое снижение показателя ОДА до значения «9» (7-е сут), а затем и до «3» было отмечено у особи, отличавшейся впоследствии наиболее быстрым ростом опухоли среди всех исследованных животных. В то же время в подгруппе 3, включавшей крыс с увеличенной ПЖ, данный показатель не опускался ниже значения «15». Таким образом, резкое снижение двигательной активности до визуализации опухоли мог-

ло отражать значительные нарушения системной регуляции при воспалении и формировании хронической боли и иметь прогностическое значение для ПЖ и роста опухоли на последующих этапах.

По нашему мнению, с особенностями системной регуляции могло быть связано и парадоксальное увеличение ПЖ у части животных, получавших инъекции формалина и воды. Мы предполагаем, что в этих случаях развитие «умеренной» воспалительной реакции приводило к временной активизации механизмов противоопухолевой резистентности, следствием которой было торможение роста опухоли (единственный случай) или «переключение» опухоли на режим экспансивного роста, без инфильтрации соседних тканей. Можно предположить, что в последних случаях эффекторные механизмы могли быть связаны с временным ингибированием активности матриксных металлопротеиназ, обеспечивающих инвазивный рост опухоли [12] и/или с инкапсуляцией опухоли вследствие временного усиления активности фибробластов [14].

Заключение

Впервые показано разнонаправленное влияние хронического воспаления, индуцированного формалином, на опухолевый процесс: ускорение роста трансплантированных злокачественных опухолей у большинства белых беспородных крыс-самцов при повышении продолжительности жизни у части таких животных и единичных случаях торможения роста опухоли. Интересно, что введение воды оказалось также весьма действенным фактором, продемонстрировавшим эффекты, сходные с эффектами формалиновой модели хронического воспаления, при меньшей выраженности воспалительной реакции и боли. Данное обстоятельство нуждается в дальнейшем изучении. Выявлены особенности воспалительной реакции и динамики дви-

гательной активности до формирования опухоли у крыс с разной продолжительностью жизни после трансплантации опухоли. Открыт вопрос о механизмах «устойчивости» к росту опухоли при развитии

воспалительной реакции. Полученные результаты представляют интерес в связи с актуальностью вопроса о влиянии на онкогенез воспалительных патологий костно-мышечной системы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Глантц С. *Медико-биологическая статистика*. 4-е изд., пер. с англ. М.: Практика, 1998:459. [Glantz S. *Mediko-biologicheskaya statistika [Primer of Biostatistics]*. 4th Ed. English transl. Moscow: Praktika Publ., 1998:459. (In Russian)]. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0258(19990915/30)18:17/18%3C2548::AID-SIM164%3E3.0.CO;2-A.
2. Кит О.И., Франциянц Е.М., Котиева И.М., Каплиева И.В., Трепитак Л.К., Бандовкина В.А. и др. Некоторые механизмы повышения злокачественности меланомы на фоне хронической боли у самокмышей. *Российский журнал боли*. 2017;53(2):14–20. [Kit O.I., Franciyan E.M., Kotieva I.M., Kaplieva I.V., Trepitaki L.K., Bandovkina V.A., et al. Nekotoryye mekhanizmy povysheniya zlokachestvennosti melanomy na fone khronicheskoy boli u samok myshey [Some mechanisms of increasing malignancy of B16/F10 melanoma in female mice with chronic pain]. *Rossiyskiy zhurnal boli [Russian J. of Pain]*. 2017;53(2):14–20. (In Russian)].
3. Жышкова Ю.Г., Митрофанова И.В., Завялова М.В., Слонимская Е.М., Чердынцева Н.В. *Онхолоассоциированные макрофаги*. М: Наука, 2017:224. [Kzhyshkovska Yu.G., Mitrofanova I.V., Zavayalova M.V., Slonimskaya E.M., Cherdyntseva N.V. *Opuholeassotsirovannyye makrofagi [Tumor associated macrophages]*. Moscow: Nauka Publ., 2017:224. (In Russian)].
4. Конг Х.Х., Хазиахметова В.Н., Зиганшина Л.Е. Новый метод сравнения эффективности НПВС на экспериментальных моделях воспаления при длительном наблюдении. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2016;79(11):19–25. [Kong Kh.Kh., Khaziakhmetova V.N., Ziganshina L.E. Novyy metod sravneniya ef-fektivnosti NPVS na eksperimentalnykh modelyakh vospaleniya pri dlitelnom nablyudenii [New Approach to Comparing NSAID Efficacy by Long-Term Monitoring of Experimental Inflammation Models]. *Experimental and Clinical Pharmacology*. 2016;79(11):19–25. (In Russian)]. DOI: 10.30906/0869-2092-2016-79-11-19-25.
5. Лакин Г.Ф. *Биометрия*. М.: Высшая школа, 1990:352. [Lakin G.F. *Biometrics*. Moscow: Vysshaya shkola Publ., 1990:352. (In Russian)].
6. Лучихина Л.В., Мендель О.И., Мендель В., Голухов Г.Н. Остеоартрит и возраст. Роль старения в этиологии и патогенезе заболевания. *Современная ревматология*. 2017;11(1):4–11. [Luchikhina L.V., Mendel O.I., Mendel V., Golukhov G.N. Osteoartrit i vozrast. Rol stareniya v etiologii i patogeneze zabolevaniya [Osteoarthritis and age. Role of aging in the etiology and pathogenesis of the disease]. *Sovremennaya revmatologiya [Modern Rheumatology J.]*. 2017;11(1):4–11. (In Russian)]. DOI: 10.14412/1996-7012-2017-1-4-11.
7. Самедов В.Х., Налескина Л.А., Захарычев В.Д. Морфологические изменения в карциноме Герена после криодеструкции, локальной СВЧ-гипертермии и их комбинации. *Российский онкологический журнал*. 2013;18(3):17–21. [Samedov V.Kh., Naleskina L.A., Zakharychev V.D. Morfologicheskiye izmeneniya v kartsinome Gerena posle kriodestruksii. lokalnoy SVCh-gipertermii i ikh kombinatsii [Morphological changes during Geren carcinoma after cryoblation, a local microwave hyperthermia and their combination]. *Russian J. of Oncology*. 2013;18(3):17–21. (In Russian)].
8. Antonelli M., Kushner I. It's time to redefine inflammation. *FASEB J*. 2017;31(5):1787–1791. DOI:10.1096/fj.201601326R.
9. Chovatiya R., Medzhitov R. Stress, Inflammation, and Defense of Homeostasis. *Mol. Cell*. 2014;54(2):281–288. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.030>.
10. Flamant M., Roblin X. Inflammatory bowel disease: towards a personalized medicine. *Therap. Adv. Gastroenterol*. 2018;11:1–15. DOI: 10.1177/1756283X17745029.
11. Grabovskaya S.V., Salyha Y.T. Do Results of the Open Field Test Depend on the Arena Shape? *Neurophysiology*. 2014;46(4):376–380. DOI: 10.1007/s11062-014-9458-x.
12. Knight B.E., Kozlowski N., Havelin J., King T., Crocker S.J., Young E.E., et al. TIMP-1 Attenuates the Development of Inflammatory Pain Through MMP-Dependent and Receptor-Mediated Cell Signaling Mechanisms. *Front. Mol. Neurosci*. 2019;12:220. DOI: 10.3389/fnmol.2019.00220.
13. Korniluk A., Koper O., Kemona H., Dymicka-Piekarska V. From inflammation to cancer. *Ir. J. Med. Sci*. 2017;186:57–62. DOI: 10.1007/s11845-016-1464-1470.
14. Mescher A.L. Macrophages and fibroblasts during inflammation and tissue repair in models of organ regeneration. *Regeneration (Oxf)*. 2017;4(2):39–53. DOI:10.1002/reg2.77.
15. Shinko D., Diakos C.I., Clarke S.J., Charles K.A. Cancer-Related Systemic Inflammation: The

Challenges and Therapeutic Opportunities for Personalized Medicine. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2017;102(4):599–610. DOI:10.1002/cpt.789.

16. Su Y.S., Sun W.H., Chen C.C. Molecular mechanism of inflammatory pain. *World J. Anesthesiol.* 2014;3(1):71–81. DOI: 10.5313/wja.v3.i1.71.

17. Zhukova G.V., Shikhliarova A.I., Barteneva T.A., Goroshinskaya I.A., Gudtskova T.N., Bragina M.I., et al. Some approaches to the activation of antitumor resistance mechanisms and functional analogs in the categories of synergetics. *Biophysics.* 2016;61(2):303–315. DOI: 10.1134/S0006350916020251.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Жукова Галина Витальевна*, д.б.н., ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России;
e-mail: galya_57@mail.ru

Шихлярова Алла Ивановна, д.б.н., проф., ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России;
e-mail: shikhliarova.a@mail.ru

Протасова Татьяна Пантелеевна, к.б.н., ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России;
e-mail: protasovatp@yandex.ru

Лукбанова Екатерина Алексеевна, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России;
e-mail: katya.samarskaja@yandex.ru

Заикина Екатерина Владиславовна, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России;
e-mail: katherine_bio@mail.ru

Волкова Анастасия Владимировна, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России;
e-mail: volkovaav58@mail.ru

Ходакова Дарья Владиславовна, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России;
e-mail: cocotail.moxuto@yandex.ru

Galina V. Zhukova*, Dr. Sci. (Biol.), National Medical Research Centre for Oncology of the Ministry of Health care of Russia;
e-mail: galya_57@mail.ru

Alla I. Shikhliarova, Dr. Sci. (Biol.), Prof., National Medical Research Centre for Oncology of the Ministry of Health care of Russia;
e-mail: shikhliarova.a@mail.ru

Tatiana P. Protasova, Cand. Sci. (Biol.), National Medical Research Centre for Oncology of the Ministry of Health care of Russia;
e-mail: protasovatp@yandex.ru

Ekaterina A. Lukbanova, National Medical Research Centre for Oncology of the Ministry of Health care of Russia;
e-mail: katya.samarskaja@yandex.ru

Ekaterina V. Zaikina, National Medical Research Centre for Oncology of the Ministry of Health care of Russia;
e-mail: katherine_bio@mail.ru

Anastasiya V. Volkova, National Medical Research Centre for Oncology of the Ministry of Health care of Russia;
e-mail: volkovaav58@mail.ru

Darya V. Khodakova, National Medical Research Centre for Oncology of the Ministry of Health care of Russia;
e-mail: cocotail.moxuto@yandex.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

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

1. Порядок направления и опубликования рукописей в рецензируемом издании

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

1.2. Рубрикация журнала:

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

1.3. Актуальные разделы журнала:

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

1.4. Общие требования к оформлению

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

1.4.2. На первой странице следует указать:

- предполагаемый раздел журнала;
- название работы;

- инициалы и фамилии авторов;
- названия учреждений, в которых была проведена работа, их полные адреса с почтовыми индексами.

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

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

Латинские названия по тексту должны быть выделены *курсивом*.

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

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

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

Сведения об авторах переводятся на английский язык.

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

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

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

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

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

1.4.7. Статистическая обработка результатов и таблицы

Таблицы должны содержать только обобщённые и статистически обработанные материалы исследования. Следует указать метод обработки результатов и необходимые для рас-

чётов исходные данные. Информация, представленная в таблицах, не должна повторяться в тексте статьи. Таблицы должны быть пронумерованы и озаглавлены. В тексте в круглых скобках дается ссылка на них, например: (табл. 1).

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

1.4.8. Иллюстративный материал

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

Требования к иллюстрациям:

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

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

1.4.9. Сокращения

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

1.4.10. Литература

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

В списке литературы приводятся:

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

Пример:

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

References:

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

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

Пример:

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

References:

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

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

Пример:

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

References:

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

- для сайта: ссылка на страницу в сети Интернет.

Пример:

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

1.5. Корректурa

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

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

1.7. Адрес редакции

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

- Электронные адреса:

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

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

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

1.8. Сроки опубликования работ

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

2. Порядок рецензирования статей, направленных в редакцию рецензируемого издания

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

2.2. Рукопись научной статьи, поступившая в редакцию журнала «Биомедицина», рассматривается ответственным секретарём на предмет соответствия профилю журнала, тре-

бованиям к оформлению, регистрируется. Отв. секретарь направляет статью на рецензирование одному или, при необходимости, двум рецензентам.

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

2.4. Рецензенты уведомляются о том, что присланные им рукописи являются частной собственностью авторов и относятся к сведениям, не подлежащим разглашению. Рецензентам не разрешается делать копии статей для своих нужд. Рецензирование проводится конфиденциально (одностороннее «слепое»). Нарушение конфиденциальности возможно только в случае заявления рецензента о недостоверности или фальсификации материалов, изложенных в статье.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- соответствие материала, изложенного в статье, профилю журнала;
- актуальность содержания статьи: соответствует ли уровень изложенного в ней материала современным достижениям науки и техники;
- значимость полученных результатов исследований (научных, практических);
- качественную и/или количественную оценку приведённого в статье материала (фактического, иллюстрационного);

- полноту и достоверность приводимых сведений;
- правильность и точность используемых (или вводимых) определений и формулировок;
- оценку литературного стиля изложения материала;
- обоснованные выводы о статье в целом, замечания, при необходимости — рекомендации по её улучшению.

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

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

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



ЧЕРНОВ ЮРИЙ НИКОЛАЕВИЧ
(05.11.1937 – 01.01.2021)

Редакция научного журнала «Биомедицина» с глубоким прискорбием сообщает, что 1 января 2021 года ушел из жизни доктор медицинских наук, клинический фармаколог высшей врачебной квалификации, заслуженный врач РФ, академик Международной академии человека в аэрокосмических системах, член-корреспондент РАЕН, профессор кафедры клинической фармакологии Воронежского государственного медицинского университета имени Н.Н. Бурденко Юрий Николаевич Чернов.

Всю жизнь профессор Ю.Н. Чернов посвятил развитию авиакосмической радиобиологии и клинической фармакологии. Работал врачом-терапевтом, заведующим здравпунктом и главным врачом учреждений здравоохранения Липецкой области, прошёл путь от студента до заведующего созданной им кафедры клинической фармакологии и декана лечебного факультета ВГМУ имени Н.Н. Бурденко.

В 1971 году в ВГМУ имени Н.Н. Бурденко защитил диссертацию на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, а в 1991 году — докторскую диссертацию по специальности. Плодотворная работа связывала Ю.Н. Чернова с Научным центром биомедицинских технологий и главным редактором научного журнала «Биомедицина» Н.Н. Каркищенко, вступившим в качестве его научного консультанта.

Профессор Ю.Н. Чернов — автор более 500 научных публикаций, 50-ти патентов и программ ЭВМ. Под его руководством подготовлено и защищено 32 кандидатские и 4 докторские диссертации. Заслуги Юрия Николаевича были по достоинству оценены, в т. ч. званием «Отличник здравоохранения», почетной грамотой Главкома ВВС и медалью «Ветеран ВВС», орденом «Дружбы народов», медалью ордена «За заслуги перед Отечеством» II степени и многими другими наградами и премиями.

Светлая память о талантливом исследователе, вдумчивом учёном, педагоге, передавшем бесценный опыт студентам и аспирантам и вырастившем себе достойную смену, добром и обаятельным человеке Ю.Н. Чернове навсегда сохранится в наших сердцах.

*Редакция научного журнала «Биомедицина»,
главный редактор академик Н.Н. Каркищенко*

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

Уважаемые коллеги!

Приглашаем Вас принять участие в **ежегодной научно-практической конференции «Биомедицина и биомоделирование»**, которая будет проводиться Научным центром биомедицинских технологий ФМБА России **26–27 мая 2021 года**.

Предполагаемые темы для формирования программы Конференции:

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

Формат проведения Конференции: очный и дистанционный.

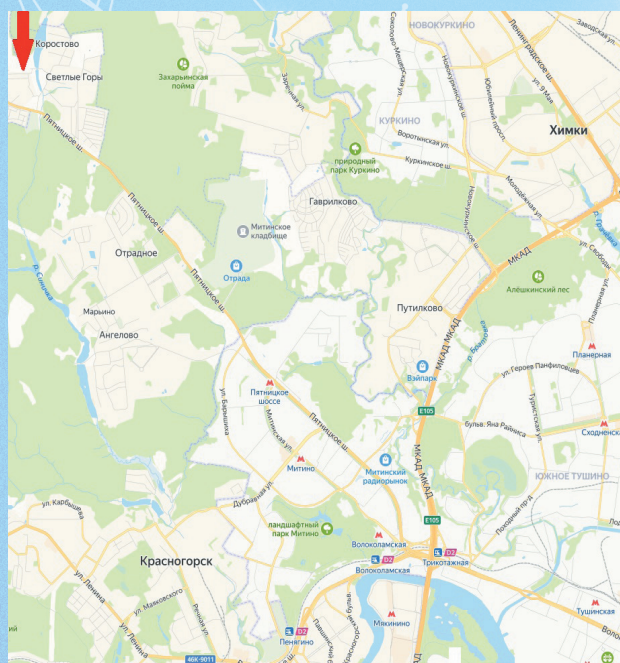
Регламент: доклад на пленарном заседании — 20 мин, на секциях — 10 мин.

Оформление докладов: в виде кратких сообщений (до 4 стр., до 15 ссылок), согласно Правилам направления рукописей научных работ в журнале «Биомедицина».

Просим авторов направить материалы докладов посредством электронной почты до **16 апреля 2021 года**.

Контакты и схема проезда до НЦБМТ ФМБА России:

Адрес: 143442, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, влд. 1;
тел.: (495) 561-52-64; e-mail: info@scbmt.ru, scbmt@yandex.ru



Проезд от станции метро «Пятницкое шоссе» на автобусе 575, 32- (прямой), маршрутном такси 164к, 575, 1016, 1212к, «Митино-Брёхово» до остановки «Марьино-Знаменское», далее пешком до Центра через посёлок, на автобусе 32 (с заездом в Светлые горы) до остановки «Светлые горы». На автомобиле: по Пятницкому шоссе (6 км от МКАД) до поворота на Светлые горы, мимо пруда до фельдшерского пункта, после него поворот по указателю налево, между двух прудов по дамбе прямо до Центра.