

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

ISSN 2074-5982 (print)

БИОМЕДИЦИНА

SCIENTIFIC JOURNAL

JOURNAL BIOMED

Том (Vol.) 17

2021

2



Зарегистрирован Лейтрагин® — лекарственный препарат для лечения и профилактики поражения легких вирусной природы, разработанный НЦБМТ ФМБА России

25 мая 2021 г. Министерством здравоохранения Российской Федерации был зарегистрирован ингаляционный лекарственный препарат — Лейтрагин®, предназначенный для лечения и профилактики пневмонии, осложняющей течение новой коронавирусной инфекции (COVID-19), разработанный в Федеральном медико-биологическом агентстве.

Лейтрагин® — это первый представитель принципиально нового класса противовоспалительных средств, доказавший свою высокую эффективность при лечении и профилактике «цитокинового шторма» — жизнеугрожающего осложнения коронавирусной инфекции, являющегося пусковым механизмом развития острого респираторного дистресс-синдрома, полиорганной недостаточности и нарушений свертывающей системы крови — основных причин смерти при COVID-19.

Принципиальным отличием антифлогистического действия Лейтрагина® от других препаратов, использующихся при терапии данного ургентного синдрома, является его способность одномоментного воздействия сразу на несколько основных сигнальных путей в иммунной системе, подавляя высвобождение множества цитокинов и других медиаторов воспаления. Лейтрагин® характеризуется высокой безопасностью при его применении. Об этом свидетельствует отсутствие сообщений о развитии нежелательных побочных эффектов в случае его назначения пациентам с COVID-19. Это положительно отличает Лейтрагин® от всех других антицитокиновых препаратов.

С марта 2020 года по настоящее время Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России проводит интенсивную научно-исследовательскую работу в этом направлении. За этот период Центру удалось разработать неинфекционную модель острого респираторного дистресс-синдрома на мышах, по своим основным патофизиологическим характеристикам полностью идентичную таковой у людей. Был осуществлен скрининг множества молекул-кандидатов и произведен отбор наиболее перспективных. В кратчайшие сроки были проведены доклинические исследования по изучению эффективности и безопасности потенциального лекарственного препарата. С 15 апреля 2020 года были начаты клинические исследования Лейтрагина®, которые проводились в нескольких научно-клинических центрах ФМБА России. Исследования подтвердили высокую эффективность и безопасность применения данного лекарственного средства у пациентов с пневмонией при COVID-19, по сравнению со стандартной терапией. В ходе исследований, участие в которых приняли 320 пациентов с новой коронавирусной инфекцией, было установлено, что в группе пациентов, получавших Лейтрагин®, не было ни одного смертельного исхода и случаев его аггра-

вации. Время выздоровления пациентов, получавших Лейтрагин®, сокращалось до 8 суток по сравнению с 14 сутками в контрольной группе пациентов, получавших стандартную терапию.

Лейтрагин® является оригинальным отечественным лекарственным препаратом с полным технологическим циклом производства на территории Российской Федерации. Препарат запатентован ФМБА России и в настоящее время начато его промышленное производство.



ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий
ФМБА России»

БИОМЕДИЦИНА

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Издается с 2005 г.
4 выпуска в год

2021, Том 17, № 2

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. 2

БИОМЕДИЦИНА

Biomeditsina

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

■ Главный редактор

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

■ Заместители главного редактора

Каркищенко Владислав Николаевич, д.м.н., проф.
Помыткин Игорь Анатольевич, к.х.н.

■ Ответственный секретарь

Алимкина Оксана Владимировна

■ Члены редакционного совета

Анохин Константин Владимирович, д.м.н., проф., акад. РАН (Москва, Россия)
Ачкасов Евгений Евгеньевич, д.м.н., проф. (Москва, Россия)
Баранов Виктор Михайлович, д.м.н., проф., акад. РАН (Москва, Россия)
Быков Анатолий Тимофеевич, д.м.н., проф., чл.-корр. РАН (Сочи, Россия)
Влахос Витан, д.м.н., проф., акад. Болгарской академии наук и искусств (София, Болгария)
Воевода Михаил Иванович, д.м.н., проф., акад. РАН (Новосибирск, Россия)
Галенко-Ярошевский Павел Александрович, д.м.н., проф., чл.-корр. РАН (Краснодар, Россия)
Дубина Михаил Владимирович, д.м.н., акад. РАН (Санкт-Петербург, Россия)
Дыгай Александр Михайлович, д.м.н., проф., акад. РАН (Томск, Россия)
Зефиоров Андрей Львович, д.м.н., проф., акад. РАН (Казань, Россия)
Кит Олег Иванович, д.м.н., проф., чл.-корр. РАН (Ростов-на-Дону, Россия)
Кузденбаева Раиса Салмаганбетовна, д.м.н., проф., акад. НАН Казахстана (Нур-Султан, Казахстан)
Кукес Владимир Григорьевич, д.м.н., проф., акад. РАН (Москва, Россия)
Макляков Юрий Степанович, д.м.н., проф. (Ростов-на-Дону, Россия)
Максимович Наталия Евгеньевна, д.м.н., проф. (Гродно, Республика Беларусь)
Матисов 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:	10.06.2021

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:	10.06.2021

■ МЕТОДЫ И ТЕХНОЛОГИИ БИОМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

- Н.Н. Каркищенко, Д.Б. Чайванов, Ю.А. Чудина, А.А. Николаев, А.А. Варганов**
 Дискриминантный анализ показателей согласованной работы сердца и сосудов в норме и при патологии 8
- Е.А. Вальдман, В.А. Крайнева, С.О. Котельникова, М.С. Садовский**
 Модель «выученной беспомощности» у крыс: возможности и ограничения при оценке депрессивно-подобного состояния и эффектов антидепрессантов. 22
- А.М. Морозов, А.Н. Сергеев, С.В. Жуков, А.Н. Пичугова, М.А. Беляк, А.Д. Морозова, В.Ф. Думанов**
 О необходимости и пределах вивисекционных экспериментов в медицине 35
- К.А. Пазиненко, Н.Н. Чучкова, М.В. Сметанина, О.А. Пазиненко, К.Э. Пантелеев, Г.В. Иванов, Н.В. Кормилиня**
 Динамика биохимических и цитологических показателей крови крыс при моделировании хронической алиментарной метионин-обусловленной гомоцистеинемии 46
- Е.Ю. Чистякова, С.В. Оковитый, В.Н. Юсковец, Д.С. Лисицкий, А.Б. Верведа**
 Актопротекторная активность комбинированных соединений диметиламиноэтанола, содержащих интермедиаты цикла трикарбоновых кислот 58
- ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В БИОМЕДИЦИНЕ
- С.М. Адекенов, В.Н. Каркищенко, М.С. Нестеров, Д.А. Абаимов, А.К. Сариев**
 Изучение антигипоксических свойств гармина гидрохлорида в эксперименте 71
- УЭ. Ешкуллов, В.А. Тарбоков, С.Ю. Иванов, Н.А. Ночовная, А.Д. Дымников, Р.С. Алымбаев**
In vitro исследование биосовместимости титановых сплавов с модифицированной поверхностью 79
- Е.Р. Милаева, М.А. Додохова, Д.Б. Шпаковский, Т.А. Антоненко, А.В. Сафроненко, И.М. Котиева, Е.Ф. Комарова, Е.В. Ганцгорн, М.С. Алхусейн-Кулягинова**
 Механизмы цитотоксического действия оловоорганических соединений. 88

■ METHODS AND TECHNOLOGIES OF BIOMEDICAL RESEARCH

- Nikolay N. Karkischenko, Dmitry B. Chaivanov, Yulia A. Chudina,
Andrey A. Nikolaev, Alexander A. Vartanov**
Discriminant Analysis of the Coordinated Work Indicators of the Heart
and Blood Vessels in Health and Disease 8
- Elena A. Valdman, Valentina A. Kraineva, Svetlana O. Kotelnikova, Maksim S. Sadovsky**
The “Learned Helplessness” Model in Rats: Possibilities and Limitations in Assessing
a Depressive-Like State and Effects of Antidepressants 22
- Artem M. Morozov, Aleksey N. Sergeev, Sergei V. Zhukov, Anastasiya N. Pichugova,
Maria A. Belyak, Anastasia M. Morozova, Vladimir F. Dumanov**
About the Necessity and Limits of Vivisectional Experiments in Medicine 35
- Kseniya A. Pazinenko, Natalya N. Chuchkova, Marina V. Smetanina, Oleg A. Pazinenko,
Kirill E. Pantelev, Grigory V. Ivanov, Natalya V. Kormilina**
Dynamics of Biochemical and Cytological Parameters of Rat Blood in Simulated
Chronic Alimentary Methionine-Induced Homocysteinemia 46
- Elizaveta Yu. Chistyakova, Sergey V. Okovityi, Valerii N. Yuskovec,
Dmitrii S. Lisitskii, Alexey B. Verveda**
Actoprotective Activity of Dimethylaminoethanol Compounds Combined
with Intermediates of the Citric Acid Cycle 58
- ## ■ PRECLINICAL RESEARCH IN BIOMEDICINE
- Sergazy M. Adekenov, Vladislav N. Karkischenko, Maxim S. Nesterov,
Denis A. Abaimov, Abrek K. Sariev**
The Experimental Study of the Antihypoxic Properties of Harmine Hydrochloride. 71
- Urmat E. Eshkulov, Vladislav A. Tarbokov, Sergey Yu. Ivanov,
Nadezhda A. Nochovnaya, Alexandr B. Dymnikov, Ruslan S. Alymbaev**
In vitro Researches into the Biocompatibility of Titanium Alloys with a Modified Surface . . . 79
- Elena R. Milaeva, Margarita A. Dodokhova, Dmitriy B. Shpakovsky, Taisiya A. Antonenko,
Andrej V. Safronenko, Inga M. Kotieva, Ekaterina F. Komarova, Elena V. Gantsgorn,
Margarita S. Alkhuseyn-Kulyaginova**
Mechanisms of the Cytotoxic Action of Organotin Compounds. 88



ДИСКРИМИНАНТНЫЙ АНАЛИЗ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СОГЛАСОВАННОЙ РАБОТЫ СЕРДЦА И СОСУДОВ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

Н.Н. Каркищенко¹, Д.Б. Чайванов^{2*}, Ю.А. Чудина², А.А. Николаев², А.А. Варганов²

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

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

Предложен дискриминантный метод моделирования и количественной оценки согласованности регуляторных механизмов в сердечно-сосудистой системе (ССС) практически здоровых волонтеров и при нарушениях кровообращения, сопряженных с остеохондрозом шейного отдела позвоночника (ОШОП) и соматоформной вегетативной дисфункцией (СВД). Конгруэнтность параметров ЭКГ-интервалометрии (ДКИ) и длительностей пульсовой волны (ДПВ) по фотоплетизмограммам (ФПГ) волонтеров устанавливали путём вычислений мер различий и отклонений от средних значений, через коэффициенты смещения, наклона аппроксимирующей прямой, их достоверности и корреляции трендовой модели с исходными данными. Установлены грубые нарушения конгруэнтности в работе эфферентных и афферентных регуляторных механизмов ССС, рассогласование и снижение в сравнении с нормой ДКИ и ДПВ, существенное снижение их аппроксимации у волонтеров с СВД. У волонтеров с ОШОП отклонения в ДКИ и ДПВ от их средних значений много ниже, чем у волонтеров с СВД, и уступают таковым у здоровых испытуемых. Как и при СВД, по показателям меры различий эти пациенты уступают здоровым волонтерам.

Ключевые слова: дискриминантный анализ, соматоформная вегетодисфункция (СВД), остеохондроз шейного отдела позвоночника (ОШОП), нарушение кровоснабжения головного мозга, вертебробазилярный синдром, длительности кардиоинтервала и пульсовой волны, конгруэнтность работы сердца и сосудов, трендовая модель

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Каркищенко Н.Н., Чайванов Д.Б., Чудина Ю.А., Николаев А.А., Варганов А.А. Дискриминантный анализ показателей согласованной работы сердца и сосудов в норме и при патологии. *Биомедицина*. 2021;17(2):8–21. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-2-8-21>

Поступила 12.04.2021

Принята после доработки 27.04.2021

Опубликована 10.06.2021

DISCRIMINANT ANALYSIS OF THE COORDINATED WORK OF THE HEART AND BLOOD VESSELS IN HEALTH AND DISEASE

Nikolay N. Karkischenko¹, Dmitry B. Chaivanov^{2,*}, Yulia A. Chudina², Andrey A. Nikolaev²,
Alexander A. Vartanov²

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

² National Research Center "Kurchatov Institute"
123182, Russian Federation, Moscow, Akademika Kurchatova Square, 1

A discriminant method was proposed for modeling and quantifying the consistency of regulatory mechanisms in the cardiovascular system (CVS) of apparently healthy volunteers and those suffering from circulatory disorders associated with cervical spine osteochondrosis (OCS) and somatoform autonomic dysfunction (SAD). The congruence of the parameters of ECG intervalometry (DCI) and pulse wave duration (PWD) according to the volunteers' photoplethysmograms (PPG) was established by calculating the disparity measure and deviations from the mean values using the coefficients of displacement, slope of the approximating straight line, as well as by comparing the reliability and correlation of the trend model with the initial data. We discovered gross violations of congruence in the work of efferent and afferent regulatory CVS mechanisms, mismatch and decrease in comparison with the norm of DCI and PWD, a significant decrease in their approximation in the SAD volunteers. In volunteers with OCS, deviations in DCI and PWD from their mean values are much lower than in those with SAD, being inferior compared to healthy volunteers. Similar to SAD, these patients are inferior to healthy volunteers in terms of the disparity measure.

Keywords: discriminant analysis, somatoform vegetative dysfunction (SVD), osteochondrosis of the cervical spine (OSOP), impaired blood supply to the brain, vertebrobasilar syndrome, duration of the cardio-interval and pulse wave, congruence of the heart and blood vessels, trend model

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

For citation: Karkischenko N.N., Chaivanov D.B., Chudina Yu.A., Nikolaev A.A., Vartanov A.A. Discriminant Analysis of the Coordinated Work Indicators of the Heart and Blood Vessels in Health and Disease. *Journal Biomed.* 2021;17(2):8–21. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-2-8-21>

Submitted 12.04.2021

Revised 27.04.2021

Published 10.06.2021

Введение

Согласованность работы разных разделов и систем сердечно-сосудистой системы является предметом огромного числа исследований и острых дискуссий уже на протяжении полутора столетий. Несмотря на то, что еще в 1899 г. А.С. Догель изучил и описал структурно-функциональную систему интрамуральных нейронов сердца, до последнего времени доминирует мнение о превалирующей роли экстракардиальных механизмов, прежде всего симпатико-парасимпатических, в регуляции его дея-

тельности [14]. В то же время важнейшая роль интракардиальной нервной регуляции афферентных систем сердца [8, 9] через депрессорные, блуждающие нервы, корешки шейных и грудных сегментов спинного мозга и другие пути не всегда учитывается в клинико-диагностических, фармакологических и морфо-функциональных исследованиях. Начиная с древней Греции, пульсовой диагностикой владели все лекари, а доведённое до совершенства её описание дано в «Каноне врачебной науки» и других трудах Авиценны (Абу али ибн Сина,

980–1037 гг.), в которых приведены изоцирковые трактовки каждого из тактов четырехтактной пульсовой волны. Десятки диагнозов с высокой точностью ставились лишь на основании этих приёмов, которые и сегодня в практически неизменном виде, несмотря на прогресс в инструментальных инновационных исследованиях последнего времени, присутствуют и используются в медицине, физиологии и психологии.

Дисфункция регуляторных систем ЦНС, нарушения эфферентной импульсации и несогласование между интракардиальными нейрофизиологическими процессами и сбоями в афферентном звене внутрисердечного нервного аппарата [3, 8, 15] и его влияния на периферическую нервную и сосудистую системы являются основной причиной электрической нестабильности миокарда как причины фатальных нарушений сердечного ритма и кардиальной смерти [3, 9, 17–19].

Казалось бы, разные и не всегда учитываемые экстракардиальные нарушения, такие как дисбаланс нейровегетативной регуляции, генетические дефекты, вертебробазиллярная недостаточность или вертебробазиллярный синдром, шейный остеохондроз, синдром позвоночной артерии, вегетозы соматоформной природы, ОРДС и другие гастроинтестинальные или ренальные патологии, становятся причиной грозных нарушений электрической стабильности сердца [3, 12, 13] и предвестниками кардиальной смерти [2, 13, 16], требующей упреждающей и превентивной лекарственной профилактики [4]. Сердечно-сосудистая система, как и весь организм человека, действует при всем многообразии своих функций как единый взаимозависимый и саморегулируемый механизм поддержания гомеостаза, и нарушение любого из звеньев моментально отображается и сказывается на параметрах сопряженных элементов, включая системы компенсации и протекции.

Известно, что ишемия спинного и головного мозга, сопровождающая различные

патологии сосудов, является фактором развития органических и психических расстройств [1]. Предпосылкой недостаточности мозгового кровоснабжения могут стать сосудистые заболевания различного генеза, в частности, провоцирующие изменения тонуса сосудов при соматоформной вегетативной дисфункции (СВД) [1] и возникновение вертебробазиллярного синдрома при остеохондрозе шейного отдела позвоночника (ОШОП) [10]. Очевидно, что при данных патологиях должны обнаруживаться компенсаторные изменения работы сердца и сосудов.

В ранее проведенных нами исследованиях [6] выявили, что испытуемые с сосудистыми патологиями при СВД и ОШОП характеризуются снижением согласованности работы сердца и сосудов по сравнению с нормой. Согласованность работы сердца и сосудов определяли по совпадению длительности кардиоинтервалов (ДКИ) с длительностью пульсовой волны (ДПВ), для этого использовали процедуру построения аппроксимирующей прямой линейной зависимости между ДКИ и ДПВ. Совпадение между ДКИ и ДПВ определяли на основе коэффициента наклона (КН) и коэффициента смещения (КС) аппроксимирующей прямой, дисперсии точек аппроксимирующей прямой (Д) и среднеквадратичного отклонения ДКИ от ДПВ (СКО) [11]. Анализ полученных данных позволил выявить наличие значимых различий по данным показателям в группах с сосудистыми патологиями и нормы. Оказалось, что наибольшая согласованность работы сердца и сосудов характерна для группы нормы, у групп с сосудистыми патологиями согласованность снижена. Встает закономерный вопрос, какие показатели согласованности работы сердца и сосудов позволят дифференцировать рассмотренные группы между собой.

В связи с этим **целью** настоящей работы является определение критериев разделения на группы: практически здоровые, с недостаточностью мозгового кровоснабжения

при ОШОП, с недостаточностью мозгового кровоснабжения при СВД. Основной задачей исследования было выявить показатели согласованной работы сердца и сосудов, которые обладают способностью дифференцировать данные группы друг от друга.

Материалы и методы

Исследование было выполнено на базе ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России». Волонтеры, участвующие в исследовании, были ознакомлены с условиями проведения его процедуры, одобренной этическим комитетом, и подписывали информированное добровольное согласие.

В исследовании приняли участие три группы волонтеров. Первая группа состояла из практически здоровых волонтеров и включала 15 человек (1 мужчина и 14 женщин, средний возраст 25 лет) без каких-либо патологий шейного отдела позвоночника, сердечно-сосудистых заболеваний и нарушений мозгового кровообращения (1 — группа нормы). Вторая группа состояла из 6-ти волонтеров (3 мужчины и 3 женщины, средний возраст 34 года) с синдромом позвоночной артерии при остеохондрозе шейного отдела позвоночника (2 — группа с ОШОП). Третья группа включала 14 волонтеров (4 мужчины и 10 женщин, средний возраст 29 лет) с синдромом соматоформной дисфункции вегетативной нервной системы (3 — группа с СВД). Отбор волонтеров осуществлялся врачами-специалистами в области кардиологии и неврологии.

Процедура эксперимента состояла в том, что у каждого волонтера отдельно в спокойном состоянии в положении сидя в течение 10 мин осуществляли запись электрокардиограммы (ЭКГ) в стандартном отведении и фотоплетизмограммы (ФПГ) через ушной электрод с помощью аппаратно-программного комплекса «Реакор» («Медиком МТД», Россия). Регистрацию ЭКГ про-

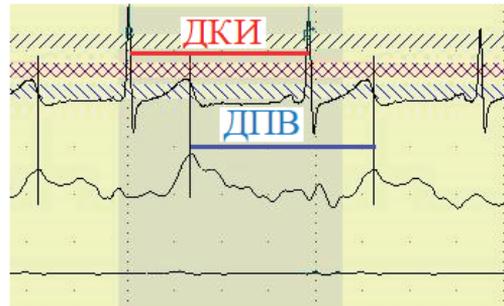


Рис. 1. Пример записи ЭКГ (сверху) и ФПГ (снизу): красной линией обозначена длительность кардиоинтервала, а синей линией показана длительность пульсовой волны [6].

Fig. 1. An example of ECG recording (top) and PPG (bottom): the red line indicates the duration of the cardiointerval; the blue line indicates the duration of the pulse wave [6].

дили с помощью психофизиологического телеметрического устройства «Реакор-Т», ФПГ регистрировали с помощью фотоэлектрического датчика, расположенного на мочке уха с левой стороны. Запись ЭКГ и ФПГ осуществлялась синхронно (рис. 1). На основе записи ЭКГ определяли длительность кардиоинтервала (ДКИ), которую вычисляли как разность между соседними пиками R. На основе записи ФПГ определяли длительность пульсовой волны (ДПВ), которую вычисляли как разность между соседними пиками волны пульса.

Результаты исследований

У каждого волонтера регистрировали значения ДКИ и ДПВ, при сравнении которых устанавливали показатели их совпадения, оцениваемые нами как показатели согласованной работы сердца (ДКИ) и сосудов (ДПВ). На их основании рассчитывали и получали следующие параметры:

КМР — квадрат меры различия между ДКИ и ДПВ, вычисляемый как среднее арифметическое суммы квадратов разностей ДКИ и ДПВ;

МР — мера различия между ДКИ от ДПВ, которое вычисляли как корень квадратный из КМР;

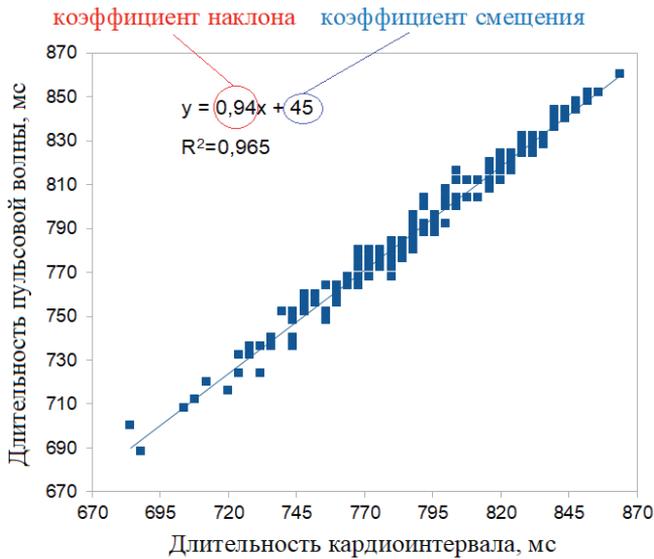


Рис. 2. График трендовой модели зависимости ДКИ и ДПВ (пример данных волонтера из группы нормы). Аппроксимирующая прямая характеризуется коэффициентом наклона, коэффициентом смещения и коэффициентом достоверности аппроксимации (R^2) [6].

Fig. 2. The dynamics of the trend model of the duration of cardiointervals vs. pulse wave (data from a volunteer from the control group). The approximating straight line is characterized by the slope coefficient, the displacement coefficient and the approximation confidence coefficient (R^2) [6].

ОС — отклонение ДКИ и ДПВ от их среднего значения, которое вычисляли как корень квадратный среднего арифметического от суммы квадратов разностей значений ДКИ и ДПВ от их общего среднего;

КН — коэффициент наклона аппроксимирующей прямой ДКИ и ДПВ;

КС — коэффициент смещения аппроксимирующей прямой ДКИ и ДПВ;

КДА — коэффициент достоверности аппроксимации, который показывает степень соответствия (корреляцию) трендовой модели исходным данным.

Показатели КН, КС и КДА вычисляли путем построения *трендовой модели* зависимости ДКИ и ДПВ и анализа *аппроксимирующей* прямой (рис. 2).

Показатели КМР и МР отражают степень отклонения величин ДКИ и ДПВ друг от друга: чем больше значение данных показателей, тем больше отличаются по длительности кардиоинтервалы от пульса. В норме

значения КМР и МР стремятся к нулю, а при патологиях сердца и сосудов — возрастают. Показатель ОС отражает отклонение ДКИ и ДПВ от их общего среднего арифметического: чем больше значение этого показателя, тем больше отклоняется длительность кардиоинтервалов и пульса от общего среднего. С физиологической точки зрения показатели КМР и МР отражают степень совпадения между продолжительностью кардиоинтервалов и пульсовых волн в течение всего времени записи данных, а показатель ОС — степень вариативности продолжительности кардиоинтервалов и пульсовых волн.

Показатели КН, КС и КДА отражают наличие линейной связи между длительностями кардиоинтервалов и длительностями пульсовых волн. Чем больше значение КН, КДА и меньше значение КС, тем выше корреляция и устойчивее линейная зависимость между длительностью кардиоинтервалов и длительностью пульсовых

волн. С физиологической точки зрения показатели КН, КС и КДА отражают степень совпадения длительности кардионтервалов и длительности пульса в течение некоторого промежутка времени.

Все показатели согласованной работы сердца и сосудов использовали для дальнейшего анализа. Основной целью настоящего исследования было изучение способности показателей согласованной работы сердца и сосудов дифференцировать разные группы испытуемых между собой. Успешное достижение указанной цели требует использования соответствующих методов анализа полученных данных. В этом случае таким является метод дискриминантного анализа, позволяющий выявить дискриминантные свойства заданных показателей в отношении групп волонтеров.

Ниже представлены численные значения описанных ранее показателей согласованной работы сердца и сосудов и используемые для дальнейшего анализа (табл. 1).

Представленные данные обрабатывали с помощью метода канонического дискриминантного анализа с принудительным включением [7]. В качестве группирующей (зависимой) переменной для выявления наиболее информативных показателей совпадения ДКИ и ДПВ использовали переменную, указывающую на принадлежность к одной из трех групп: группа нормы, группа с ОШОП и группа с СВД, которые были обозначены соответствующим образом: 1 — группа нормы, 2 — группа с ОШОП и 3 — группа с СВД.

В качестве независимых переменных использовали следующие показатели согласованной работы сердца и сосудов: квадрат меры различия между ДКИ и ДПВ (КМР), мера различия ДКИ от ДПВ (МР), отклонение ДКИ и ДПВ от среднего значения (ОС), коэффициент наклона аппроксимирующей прямой ДКИ и ДПВ (КН), коэффициент смещения этой прямой (КС) и коэффициент достоверности аппроксимации (КДА).

Первоначально определяли наличие корреляционных связей между независимыми переменными, чтобы исключить те из них, которые имеют устойчивые связи. В табл. 2 представлены значения коэффициентов корреляции между независимыми переменными.

Наличие прямых связей обнаружили между показателями КМР и МР, между КМР и ОС, МР и ОС, КДА и КН, а наличие обратной связи — между КН и КС. Наиболее устойчивая линейная связь обнаружена между показателями КМР и МР, что является основанием удаления из дальнейшего анализа показателя КМР.

Дискриминантный анализ проводили с включением следующих независимых переменных: МР, ОС, КДА, КН и КС. На основе показателей значимости различий средних значений дискриминантной функции (табл. 3) из всех независимых переменных отобрали только те, значимость которых была менее 0,05.

Наилучшую классификационную способность модель продемонстрировала при отделении группы нормы от двух других групп ($R=0,677$), а меньшую чувствительность модель продемонстрировала в отношении разделения групп с ОШОП и с СВД ($R=0,459$). Обе полученные канонические дискриминантные функции статистически значимо разделяют исследуемые группы: значимость разделения групп с помощью первой дискриминантной функции (F_1) составляет 0,0002, для второй дискриминантной функции (F_2) значимость равна 0,0253 (табл. 4).

Полученные канонические дискриминантные функции представлены уравнениями (1) и (2):

$$F_1 = 2,183 + 0,037 \times X_1 - 0,005 \times X_2 - 3,136 \times X_3 \quad (1);$$

$$F_2 = -4,071 + 0,012 \times X_1 + 0,007 \times X_2 + 3,312 \times X_3 \quad (2),$$

где F_1 и F_2 — первая и вторая канонические дискриминантные функции; X_1 , X_2 , X_3 — значения дискриминантных переменных в исследуемых группах.

По величине стандартизованных коэффициентов (табл. 5) можно сделать вывод, что наибольший вклад в значение первой канонической дискриминантной функции внесла переменная МР, имеющая максимальное значение стандартизованного

коэффициента этой функции. В значение второй канонической функции наибольший вклад внесла переменная ОС.

Результаты проведенного дискриминантного анализа указывают на то, что существенной для отделения группы с СВД

Таблица 1. Исходные данные для проведения дискриминантного анализа для трех групп по показателям согласованной работы сердца и сосудов

Table 1. Initial data for a discriminant analysis for three groups in terms of coordinated work of the heart and blood vessels

№ исп.	Зависимая переменная		Независимые переменные				
	№ группы	КМР	МР	ОС	КН	КС	КДА
1	2	305,403	17,476	53,86	1,015	11,472	0,812
2	3	6086,907	78,019	448,644	0,949	43,873	0,941
3	3	731,06	27,038	169,974	0,979	17,567	0,949
4	1	203,517	14,266	105,778	1,019	16,051	0,965
5	1	91,242	9,552	75,915	1,081	67,704	0,976
6	3	273,893	16,550	67,122	0,995	5,382	0,885
7	2	132,324	11,503	45,039	1,044	26,167	0,884
8	3	5701,016	75,505	213,237	0,967	17,427	0,787
9	1	146,703	12,112	79,337	1,123	100,6	0,971
10	1	135,715	11,650	146,026	1,004	3,0027	0,988
11	3	1977,637	44,471	98,908	1,01	11,335	0,708
12	3	179,648	13,403	85,728	1,016	11,535	0,953
13	1	333,833	18,271	171,263	0,966	26,715	0,96
14	1	238,774	15,452	147,692	1,03	20,987	0,98
15	3	21203,48	145,614	164,559	1,006	4,877	0,975
16	2	165,263	12,855	57,163	1,029	23,364	0,907
17	1	325,08	18,030	102,968	0,885	70,653	0,949
18	1	43,976	6,631	66,119	1,035	25,153	0,982
19	1	53,784	7,334	89,542	1,013	11,918	0,987
20	1	88,651	9,415	111,345	1,000	0,296	0,986
21	1	107,342	10,361	77,208	1,014	13,022	0,964
22	3	896,356	29,939	179,922	1,059	65,562	0,945
23	2	286,131	16,915	34,271	0,519	290,66	0,462
24	1	103,57	10,177	59,034	1,022	16,035	0,944
25	1	126,16	11,232	89,993	1,006	4,928	0,97
26	3	876,589	29,607	93,219	1,016	18,253	0,819
27	3	11056,46	105,150	377,048	0,957	4,123	0,867
28	3	3501,871	59,177	120,839	0,931	60,634	0,603
29	1	99,109	9,955	122,789	1,021	15,875	0,988
30	2	118,357	10,879	33,959	0,996	2,602	0,813
31	3	988,426	31,439	125,491	0,973	25,188	0,88
32	1	29,307	5,414	62,393	1,018	13,977	0,986
33	3	4045,635	63,605	72,673	0,989	0,048	0,136
34	2	91,170	9,548	23,049	0,966	28,857	0,701
35	3	6405,193	80,032	125,194	0,978	7,648	0,672

Таблица 2. Коэффициенты корреляции между показателями согласованной работы сердца и сосудов
Table 2. Correlation coefficients of coordinated work of the heart and blood vessels

Показатель	КМР	МР	ОС	КДА	КН
Д					
СКО	0,951*				
ОС	0,509*	0,612*			
КДА	-0,114	-0,277	0,170		
КН	-0,050	-0,100	-0,016	0,468*	
КС	-0,139	-0,121	-0,124	-0,288	-0,750*

Примечание: * — обозначены коэффициенты с уровнем значимости менее 0,05.

Note: * — coefficients with a significance level less than 0.05 are provided.

Таблица 3. Оценка значимости различий средних значений дискриминантной функции
Table 3. Significance of differences between the mean values of the discriminant function

Название независимой переменной	Обозначение показателя в дискриминантной функции	Лямбда Уилкса	Критерий F	Значимость
МР	X1	0,622	9,734	0,000
ОС	X2	0,823	3,436	0,044
КДА	X3	0,696	6,983	0,003
КН		0,894	1,889	0,168
КС		0,904	1,696	0,200

Таблица 4. Оценка канонических дискриминантных функций
Table 4. Estimation of the canonical discriminant functions

Дискриминантная функция	Собственное значение	Каноническая корреляция — R	Лямбда Уилкса	Хи-квадрат	Значимость
F1	0,847	0,677	0,427	26,365	0,0002
F2	0,268	0,459	0,789	7,350	0,0253

Таблица 5. Стандартизованные коэффициенты канонических линейных дискриминантных функций
Table 5. Standardized coefficients of the canonical linear discriminant functions

Показатель	Функции	
	F1	F2
МР	0,965	0,328
ОС	-0,394	0,579
КДА	-0,482	0,509

от группы ОШОП и группы нормы является переменная МР, а для дифференциации группы с ОШОП от двух других групп существенной является переменная ОС.

Обсуждение результатов

Дополнительно был проведен анализ средних значений независимых переменных МР, ОС и КДА, который позволил выявить числовые критерии принадлежности обследуемого к одной из трех групп (табл. 6).

Из табл. 6 видно, что ни одна переменная не отделяет все три группы друг от друга, а для успешной дифференциации необходимо использовать сразу все три переменные. Анализ попарных различий между группами, проведенный путем вычисления критерия Манна—Уитни (табл. 7), показал наличие значимых различий.

Проведем сравнительный анализ значений выделенных дискриминантных переменных в группах с патологиями и в группе нормы. Переменная КДА в группе нормы

Таблица 6. Средние значения независимых переменных, использованных в дискриминантном анализе, и их доверительный интервал (уровень значимости 0,05) для каждой из трех групп

Table 6. Mean values of independent variables used in the discriminant analysis and their confidence interval (significance level 0.05) for each of the three groups

Название группы	Показатель совпадения ДКИ и ДПВ		
	МР	ОС	КДА
Норма	12,254±2,565	97,253±17,279	0,971±0,008
ОШОП	13,196±2,625	41,223±10,492	0,763±0,131
СВД	55,502±20,931	145,685±44,852	0,783±0,123

Таблица 7. Данные анализа попарных различий между группами для показателей совпадения ДКИ и ДПВ на основе критерия Манна—Уитни (U) и его уровня значимости (p)

Table 7. An analysis of pairwise differences between the groups for indicators of the coincidence of cardiointerval duration and pulse wave duration based on the Mann—Whitney test (U) and its significance level (p)

Сравниваемые группы	Показатель совпадения ДКИ и ДПВ					
	МР		ОС		КДА	
	U	p	U	p	U	p
Норма и ОШОП	32,0	0,312	0,0	0,001*	0,0	0,001*
Норма и СВД	6,0	0,000*	59,0	0,045*	11,5	0,000*
ОШОП и СВД	4,0	0,002*	0,0	0,001*	31,0	0,364

Примечание: * — отмечены значения с уровнем значимости менее 0,05.

Note: * — marked values with a significance level less than 0.05.

принимает наибольшее значение по сравнению с другими группами, в которых значение этой переменной уменьшается и примерно равно для групп с патологиями. При этом обнаружены значимые различия по показателю КДА между группами нормы и группами с патологиями, а между группами ОШОП и СВД значимых различий не обнаружено.

Переменная ОС в группе нормы принимает промежуточное значение по сравнению с другими группами. Относительно группы нормы значение переменной ОС в группе ОШОП уменьшается в 2 раза, а в группе СВД увеличивается в 1,5 раза. По показателю ОС между всеми парами групп обнаружены значимые различия.

Значение показателя МР в группе нормы принимает минимальное значение по сравнению с другими группами. В группе ОШОП значение показателя МР незначительно увеличивается по сравнению с группой нормы, а для группы СВД характерно увеличение значения показателя МР в 4,5 раза. По данному показателю группы нормы и ОШОП не имеют значимых различий.

Значимые различия по показателю МР выявлены при сравнении группы нормы и СВД, а также группы СВД и ОШОП.

Анализ значимости различий между тремя группами по показателям совпадения ДКИ и ДПВ был проведен на основе вычисления критерия Крускала—Уоллеса. Этот анализ показал наличие значимых различий между всеми тремя группами по всем показателям совпадения ДКИ и ДПВ.

На основе дискриминантного анализа и анализа средних для каждой группы были выявлены определенные паттерны значений дискриминантных переменных, специфицирующих все заданные группы. Спецификация заданных групп по паттерну значений выделенных переменных, нормированных по максимальным значениям (выраженных в процентах), наглядно представлена на рис. 3.

Показатель КДА отражает устойчивость линейной связи между ДКИ и ДПВ. Из наших данных видно, что в норме обнаруживается наиболее устойчивая линейная связь между ДКИ и ДПВ, которая в группах с па-

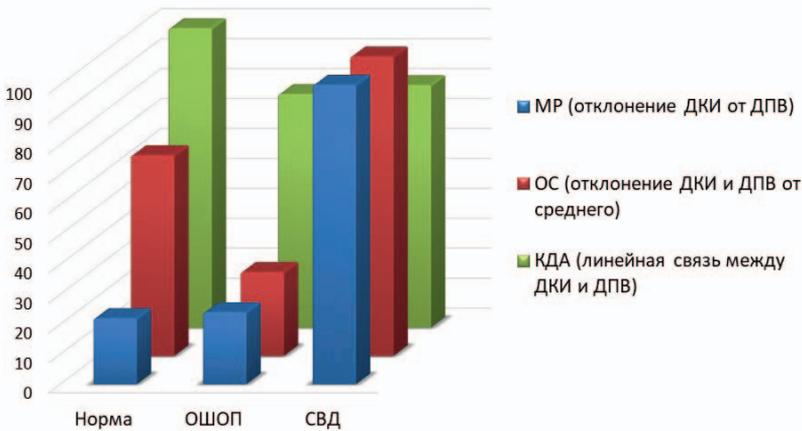


Рис. 3. Спецификация трех заданных групп: группы нормы, ОШОП и СВД с учетом выбранных переменных СКО, ОС и КДА, нормированных по максимальным значениям.

Fig. 3. Specification of the three specified groups: norm groups, osteochondrosis of the cervical spine and somatoform autonomic dysfunction, taking into account the selected variables standard deviation duration, deviation from the mean and coefficient of accuracy of approximation normalized to maximum values.

тологиями менее выражена, что указывает на уменьшение согласованности сердечной и сосудистой активности при патологиях сосудов, сопровождающихся нарушениями кровоснабжения головного мозга.

Показатель ОС отражает вариативность длительности кардиоинтервалов и пульса. Группа нормы характеризуется средней вариативностью, а рассматриваемые нами патологии — снижением или увеличением вариативности. Так, в группе ОШОП вариативность значительно ниже, а в группе СВД вариативность значительно выше по сравнению с нормой. Снижение вариативности при ОШОП, возможно, связано с механическими причинами снижения кровоснабжения головного мозга, а увеличение вариативности ДКИ и ДПВ при СВД, очевидно, обусловлено усиленным влиянием вегетативной нервной системы на просвет сосудов, что приводит к их спазмам, способствующим нарушению кровоснабжения головного мозга. Средняя вариативность, характерная для нормы, сопровождается высокой согласованностью работы сердца и сосудов, а низкая или высокая

вариативности появляются при патологиях кровоснабжения головного мозга.

Показатель MP отражает степень различия между ДКИ и ДПВ: чем меньше значение данного показателя, тем меньше отличаются по длительности кардиоинтервалы от пульсовых волн. По нашим данным, в норме показатель MP принимает минимальное значение. При ОШОП значение этого показателя мало отличается от нормы, а при СВД обнаруживается его значительный рост. Эти особенности объясняются характером патологических изменений. Сосудистые изменения при ОШОП вызваны механическим сдавливанием сосудистых элементов, а при СВД наблюдаются изменения в механизмах нервной регуляции сердечно-сосудистой системы, что отражается в виде значительных различий между длительностью кардиоинтервалов и пульсовых волн. Минимальные различия между ДКИ и ДПВ являются признаком согласованной работы сердца и сосудов, которая значительно уменьшается при сосудистых патологиях, сопровождающих СВД.

Каждая рассмотренная группа характеризуется определенным паттерном значений дискриминантных переменных. Группа нормы характеризуется высокой степенью совпадения длительности кардиоинтервалов и пульсовых волн, которая определяется максимально устойчивой линейной связью между ДКИ и ДПВ, средней вариативностью ДКИ и ДПВ и наименьшей степенью различия между ДКИ и ДПВ. Группа с патологиями характеризуется более низкой степенью совпадения ДКИ и ДПВ. Группа с ОШОП отличается неустойчивой линейной связью между ДКИ и ДПВ, низкой вариативностью ДКИ и ДПВ и малой степенью различия между ДКИ и ДПВ. Группа с СВД отличается неустойчивой линейной связью между ДКИ и ДПВ, высокой вариативностью ДКИ и ДПВ, а также высокой степенью различия между ДКИ и ДПВ. Полученные результаты можно резюмировать в виде следующих выводов:

- в ходе дискриминантного анализа вычислили две дискриминантные функции, представленные соответствующими уравнениями, позволяющие дифференцировать три заданные группы между собой;

- дискриминантная способностью разделения заданных групп обладают три из пяти рассмотренных независимых переменных: МР, ОС и КДА, отражающие степень согласованности работы сердца и сосудов;

- группа нормы характеризуется самой высокой степенью согласованности работы сердца и сосудов, которая определяется устойчивой линейной связью и минимальными различиями между ДКИ и ДПВ при средней вариативности длительности кардиоинтервалов и пульсовых волн;

- при сосудистых патологиях, сопровождающихся снижением кровоснабжения головного мозга, наблюдается снижение степени согласованной работы сердца и сосудов, проявляющееся в изменениях значений показателей совпадения ДКИ и ДПВ,

обусловленных особенностями сосудистых нарушений;

- синдром позвоночной артерии при ОШОП характеризуется снижением линейной связи и минимальными различиями между ДКИ и ДПВ при низкой вариативности длительности кардиоинтервалов и пульсовых волн;

- СВД характеризуется снижением линейной зависимости и значительным увеличением различий между ДКИ и ДПВ при очень высокой вариативности длительности кардиоинтервалов и пульсовых волн.

Заключение

Сердце, перекачивающее кровь из венозной системы в артериальную, уже никто не рассматривает просто как естественный бионасос. Оно находится под регуляторным контролем не только нейрогормональной системы, но и собственных, весьма сложных афферентных механизмов, умножаемых многообразием взаимоотношений интракардиальной и экстракардиальной нервной системы. Совершенствование инструментальных и компьютерных технологий, огромный рост высокоточных методов диагностики болезней сердца и сосудов, развитие эффективных, безопасных и доказательных биомедицинских исследований требует внедрения и приложения современных математических и статистических моделей.

Проведенные нами исследования позволили уточнить и детализировать подходы к диагностике и оптимизации выбора лекарственной профилактики при нарушениях системной экстра- и интракардиальной регуляции сердечно-сосудистой системы (ССС). Видимым преимуществом простого и удобного метода дискриминантного анализа показателей согласованной работы ССС является не только его неинвазивность, но и безусловная простота получения первичной объективной информации (ЭКГ и ФПГ+анамнестические данные),

что укладывает его в стандартные диагностические процедуры и не требует дополнительных некомфортных и неприятных процедур. Ведь даже Холтер-мониторирование АД доставляет неприятные ощущения пациенту каждые 15–30 мин, зачастую нарушая сон и искажая исходные данные. Щадящий метод дискриминантного анализа показывает взаимоотношения в работе сердца и сосудов и обеспечивает врача-диагноста, физиолога и фармаколога принципиально новой информацией, верифицирующей выводы, а также диагностические и прогностические заключения у конкретных пациентов.

При выполнении исследований у волонтеров с соматоформными вегетодистониями мы учитывали, наряду с объективными показателями, жалобы пациентов именно на наличие нестойких и преходящих болей, ощущения «перебоев и замирания» в сердце, вегето-эмоциональных реакций на стрессирующие воздействия, частые незначительные подъемы АД и учащения пульса, при отсутствии инструментально подтвержденных проявлений кардиососудистой патологии органического характера. Важно, что именно в этой группе, у пациентов, которых наиболее часто и незаслуженно обвиняют в симуляции симптомов заболеваний, нами установлен *информативный параметр* максимального расхождения между длительностями кардиоинтервалов и пульсовых волн в сравнении этих показателей с таковыми у практически здоровых волонтеров. Еще раз подчеркнем, что этот феномен говорит о грубом нарушении согласованности в работе центральной нейровегетативной регуляции ЦНС и нервно-мышечного автоматизма сердца и его афферентной системы. Это дополняют рассогласования ДКИ и ДПВ в виде их снижения от таковых у здоровых пациентов по показателям отклонения от средних значений, а также существенного падения достоверности аппроксимации. Наряду

с повышением качества диагностики нарушенных функций ССС при вегетодисфункциональных состояниях метод детерминантного анализа может стать незаменимым при проведении фармакологических проб [5] для выбора персонализированной фармакотерапии.

Как и в случае пациентов с СВД, симптомокомплекс шейных остеохондрозов, синдромов позвоночной артерии, вертебробазиллярных проявлений отличаются полиморфизмом картины, большим разбросом болевых дислокаций, ощущением нехватки воздуха, одышкой, болями в сердце, скачками АД, нарушениями мозгового кровообращения, особенно при попытках повернуть голову, и многими другими признаками. Как не удивительно, эта клиническая картина во многом схожа с СВД и мимикрирует другие заболевания. Как и при СВД, мера различия, т. е. отклонения или согласованности и совпадений длительностей кардиоинтервалов и пульсовых волн, уступает таковому у практически здоровых волонтеров. Однако наиболее яркие отличия при этой патологии выявляются по параметрам отклонения длительностей кардиоинтервалов и пульсовых волн от их средних значений (ОС). Эти параметры много ниже, чем у здоровых волонтеров, и еще выраженнее, чем у страдающих СВД. ОС-параметр может служить продуктивным признаком и, наряду с иными информативными показателями, стать подспорьем в рациональной и дифференциальной диагностике нейрогенных, сосудистых и кардиогенных нарушений при вертебральном, корешковом, кардиальном симптомокомплексах и синдроме позвоночной артерии. Метод дискриминантного анализа может быть полезен при выборе тактики немедикаментозного или фармакологического лечения, по крайней мере, позволит оптимизировать средство выбора лечения среди всего медикаментозного пейзажа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ |

1. Антонен Е.Г., Хяйникяйнен И.В. Соматоформная вегетативная дисфункция как предиктор хронической ишемии мозга. *Ученые записки Петрозаводского государственного университета. Медицинские науки*. 2014;4:43–48. [Antonen E.G., Hyajnikujajnen I.V. Somatoformnaya vegetativnaya disfunkciya kak prediktor hronicheskoy ishemi mozga [Somatoform autonomic dysfunction as a predictor of chronic brain ischemia]. *Uchenye zapiski Petrozavodskogo gosudarstvennogo universiteta. Medicinskie nauki [Scientific notes of Petrozavodsk state University. Medical science]*. 2014;4:43–48. (In Russian)].
2. Бабченко Н.В. Начальные проявления недостаточности кровоснабжения головного мозга: патоморфология, клиника, диагностика, принципы терапии. *Медицинские новости*. 2004;1:17–20. [Babchenko N.V. Nachal'nye proyavleniya nedostatochnosti krovosnabzheniya golovno mozga: patomorfologiya, klinika, diagnostika, principy terapii [Initial manifestations of insufficient blood supply to the brain: pathomorphology, clinic, diagnosis, principles of therapy]. *Medicinskie novosti [Medical news]*. 2004;1:17–20. (In Russian)].
3. Бойцов С.А., Никулина Н.Н., Якушин С.С., Акинина С.А. и др. Внезапная сердечная смерть у больных ИБС: по результатам российского многоцентрового эпидемиологического исследования заболеваемости, смертности, качества диагностики и лечения острых форм ИБС (резонанс). *Рос. кардиол. журн.* 2011;2:59–64. [Boytsov S.A., Nikulina N.N., Yakushin S.S., Akinina S.A., et al. Vnezapnaya serdechnaya smert' u bol'nykh IBS: po rezul'tatam rossiyskogo mnogotsentrovogo epidemiologicheskogo issledovaniya zabolevayemosti, smertnosti, kachestva diagnostiki i lecheniya ostrykh form IBS (rezonans) [Sudden cardiac death in patients with coronary artery disease: according to the results of a Russian multicenter epidemiological study of morbidity, mortality, quality of diagnosis and treatment of acute forms of coronary artery disease (resonance)]. *Russian cardiological journal*. 2011;2:59–64. (In Russian)].
4. Бокерия Л.А., Ревিশвили А.Ш., Неминущий Н.М. *Внезапная сердечная смерть*. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011:272. [Bokeriya L.A., Revishvili A.Sh., Neminushchiy N.M. *Vnezapnaya serdechnaya smert' [Sudden cardiac death]*. Moscow: GEOTAR-Media Publ., 2011: 272. (In Russian)].
5. Каркищенко Н.Н. *Лекарственная профилактика*. М.: Воентехлит, 2001:752. [Karkischenko N.N. *Lekarstvennaya profilaktika [Medicinal prophylaxis]*. Moscow: Voyentekhlit Publ., 2001:752. (In Russian)].
6. Каркищенко Н.Н. *Фармакологические основы терапии*. М.: IMP-Медицина, 1996:599. [Karkischenko N.N. *Farmakologicheskiye osnovy terapii [Pharmacological bases of therapy]*. Moscow: IMP-Meditsina Publ., 1996:599. (In Russian)].
7. Каркищенко Н.Н., Николаев А.А., Чудина Ю.А., Чайванов Д.Б., Вартанов А.А. Показатели согласованной работы сердца и сосудов при сосудистой патологии вертеброгенной и невертеброгенной природы. *Биомедицина*. 2020;16(2):47–59. [Karkischenko N.N., Nikolaev A.A., Chudina Yu.A., Chajvanov D.B., Vartanov A.A. Pokazateli soglasovannoy raboty serdca i sosudov pri sosudistoy patologii vertebrogennoj i nevertebrogennoj prirody [Indicators of coordinated work of the heart and blood vessels in vascular pathology of vertebrogenic and non-vertebrogenic nature]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2020;16(2):47–59. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-16-2-47-59.
8. Ким Дж. О., Мьюллер Ч.У., Клекка У.Р., Енюков И.С. *Факторный, дискриминантный и кластерный анализ*. М.: АБЕРС-Москва, 2006:479. [Kim Dzh.O., M'yuller Ch.U., Klekka U.R., Enukov I.S. *Factor, discriminant and cluster analysis*. Moscow: AVERS-Moskva Publ., 2006:479. (In Russian)].
9. Косицкий Г.И. *Афферентные системы сердца*. М.: Медицина, 1975:208. [Kositskiy G.I. *Afferentnyye sistemy serdca [Afferent systems of the heart]*. Moscow: Meditsina Publ., 1975:208. (In Russian)].
10. Лысенкова Н.О., Румянцев М.И., Кратнов А.Е. Роль вегетативной нервной системы в развитии фатальных нарушений ритма сердца у пациентов с ишемической болезнью сердца. *Доктор.Ру*. 2016;11(128):33–35. [Lysenkova N.O., Rumyantsev M.I., Kratnov A.E. Rol' vegetativnoy nervnoy sistemy v razvitiy fatal'nykh narusheniy ritma serdtsa u patientsov s ishemicheskoy bolezn'yu serdtsa [The role of the autonomic nervous system in the development of fatal cardiac arrhythmias in patients with coronary artery disease]. *Doktor.Ru*. 2016;11(128):33–35. (In Russian)].
11. Мамонова Е.Ю., Калинина М.Ю. Гемодинамические нарушения при шейном остеохондрозе у нефтяников западной Сибири. *Сибирский медицинский журнал*. 2008;2(3):69–72. [Mamonova E.Yu., Kalinina M.Yu. Gemodinamicheskie narusheniya pri shejnom osteohondroze u neftyanikov zapadnoj Sibiri [Hemodynamic disorders in cervical osteochondrosis in oil workers of Western Siberia]. *Siberian medical journal*. 2008;2(3):69–72. (In Russian)].
12. Стригина М.И., Чайванов Д.Б., Чудина Ю.А. Исследования погрешностей данных фотоплетизмограммы для анализа вариабельности сердечного ритма. *Биомедицина*. 2013;4:139–148. [Strigina M.I., Chajvanov D.B., Chudina Yu.A. Issledovaniya pogreshnostej dannyh fotopletizmogrammy dlya analiza variabel'nosti serdechnogo ritma [Studies of errors in photoplethysmogram data for analysis of heart rate variability]. *Biomedicine*. 2013;4:139–148. (In Russian)].
13. Cao J.M., Fishblin M.C., Ham J.B., Lai W.W., et al. Relationship between regional cardiac hyperin-

- nervation and ventricular arrhythmia. *Circulation*. 2000;101(16):1960–1969.
14. Chen S.W. A wavelet-based heart rate variability analysis for the study of nonsustained ventricular tachycardia. *Trans. Biomed. Eng.* 2002;49(7):736–742.
15. Dogel A.S. Zur frage über feiruren bau der herzzangli- en des menschen und der saugetiере. *Arch. Mikr. Anat.* 1899;53:234–312.
16. Ewing D.J. Heart rate variability: new risk factor in patients following myocardial infarction. *Clin. Cardiol.* 1991;14(8):683–685.
17. Nannenberг E.A., Sijbrands E.J.G., Dijkman L.M., Alders M., et al. Mortality of inherited arrhythmia syndromes: insight into their natural history. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 2012;5(2):183–189.
18. Osaka M., Saitoh H., Sasabe N., Atarashi H., et al. Changes in autonomic activity preceding onset of non-sustained ventricular tachycardia. *Ann. Noninvasive Electrocardiol.* 1996;1(1):3–11.
19. Saul J.P., Berger R.D., Albrecht P., Stein S.P., et al. Transfer function analysis of the circulation: unique insights into cardiovascular regulation. *Am. J. Physiol.* 1991;261(4,2):1231–1245.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Каркищенко Николай Николаевич, акад. РАН, чл.-корр. РАН, д.м.н., проф., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: niknik2808@yandex.ru

Чайванов Дмитрий Борисович*, к.ф.-м.н., ФГБУН Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»;
e-mail: Chayvanov_DB@nrcki.ru

Чудина Юлия Александровна, ФГБУН Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»;
e-mail: Chudina_YA@nrcki.ru

Николаев Андрей Андреевич, ФГБУН Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»;
e-mail: Nikolaev-AA@nrcki.ru

Вартанов Александр Александрович, ФГБУН Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»;
e-mail: Vartanov_AA@nrcki.ru

Nikolay N. Karkischenko, Academician of the Russian Academy of Rocket and Artillery Sciences, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: niknik2808@yandex.ru

Dmitry B. Chaivanov*, Cand. Sci. (Phis.-Math.), National Research Center “Kurchatov Institute”;
e-mail: Chayvanov_DB@nrcki.ru

Yulia A. Chudina, National Research Center “Kurchatov Institute”;
e-mail: Chudina_YA@nrcki.ru

Andrey A. Nikolaev, National Research Center “Kurchatov Institute”;
e-mail: Nikolaev-AA@nrcki.ru

Alexander A. Vartanov, National Research Center “Kurchatov Institute”;
e-mail: Vartanov_AA@nrcki.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author



МОДЕЛЬ «ВЫУЧЕННОЙ БЕСПОМОЩНОСТИ» У КРЫС: ВОЗМОЖНОСТИ И ОГРАНИЧЕНИЯ ПРИ ОЦЕНКЕ ДЕПРЕССИВНО-ПОДОБНОГО СОСТОЯНИЯ И ЭФФЕКТОВ АНТИДЕПРЕССАНТОВ

Е.А. Вальдман*, В.А. Крайнева, С.О. Котельникова, М.С. Садовский

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова»
125315, Российская Федерация, Москва, Балтийская ул., 8

Модель «выученной беспомощности» (ВБ) у крыс широко используется в наборе тестов для оценки депрессивно-подобного состояния и эффектов антидепрессантов. Модель оценивается как достаточно валидная, но имеющая ограничения по воспроизводимости. В обзоре представлены возможности использования модели для оценки симптомов депрессивно-подобного состояния и отдельных звеньев патогенеза депрессии, эффектов антидепрессантов. Описаны факторы, влияющие на воспроизводимость модели ВБ, наиболее важным из которых является различная чувствительность животных к стрессу. Приведены различные протоколы формирования и тестирования ВБ, используемые в разных исследовательских коллективах. С учетом большого количества вариантов протоколов и получаемых результатов, сравнительный анализ которых затруднен, необходима стандартизация модели ВБ в условиях каждой конкретной лаборатории. Модель ВБ целесообразно использовать в доклинических исследованиях потенциальных препаратов с антидепрессивной активностью.

Ключевые слова: модель «выученной беспомощности», доклинические исследования, антидепрессанты, депрессивно-подобное состояние, крысы

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Вальдман Е.А., Крайнева В.А., Котельникова С.О., Садовский М.С. Модель «выученной беспомощности» у крыс: возможности и ограничения при оценке депрессивно-подобного состояния и эффектов антидепрессантов. *Биомедицина*. 2021;17(2): 22–34. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-2-22-34>

Поступила 01.11.2020

Принята после доработки 11.02.2021

Опубликована 10.06.2021

THE “LEARNED HELPLESSNESS” MODEL IN RATS: POSSIBILITIES AND LIMITATIONS IN ASSESSING A DEPRESSIVE-LIKE STATE AND EFFECTS OF ANTIDEPRESSANTS

Elena A. Valdman*, Valentina A. Kraineva, Svetlana O. Kotelnikova, Maksim S. Sadovsky

Zakusov State Institute of Pharmacology
125315, Russian Federation, Moscow, Baltiyskaya Str., 8

The “learned helplessness” (LH) model in rats is widely used in a battery of tests to assess depression-like behaviour and the effects of antidepressants. The model is considered to be sufficiently valid, though having some limitations with reproducibility. This review discusses the possibilities of using the model for assessing the symptoms of a depressive-like state and the pathogenesis of depression, as well as the effects of

antidepressants. The factors affecting the reproducibility of the LH model are described, the most important of which is the different sensitivity of animals to stress. Several protocols for the induction and testing of LH, which are used by different research teams, are presented. Due to the difficulty of comparing the results obtained using different LH protocols, LH models should be standardized for use in individual laboratories. LH models are worth using in preclinical studies of potential drugs exhibiting antidepressant activity.

Keywords: “learned helplessness” model, preclinical study, antidepressants, depressive-like behaviour, rats

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

For citation: Valdman E.A., Kraineva V.A., Kotelnikova S.O., Sadovsky M.S. The “learned helplessness” model in rats: possibilities and limitations in assessing a depressive-like state and effects of antidepressants. *Journal Biomed.* 2021;17(2):22–34. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-2-22-34>

Submitted 01.11.2020

Revised 11.02.2021

Published 10.06.2021

Введение

Депрессия является гетерогенным заболеванием, характеризуется множеством психологических и психосоциологических проявлений эмоционального, мотивационного, когнитивного дефицита и лежащих в основе их развития нейробиологических изменений при отсутствии специфических биомаркеров. Поэтому моделирование депрессии у животных является сложной задачей. Большинство экспериментальных моделей депрессии основано на воздействии остроого или хронического стресса — тест неизбегаемого плавания», «подвешивания за хвост», «выученная беспомощность», мягкий непредсказуемый стресс, стресс раннего периода жизни, социальная изоляция. Для изучения патогенеза депрессии используются также модели, полученные в результате генетических манипуляций (трансгенные или нокаутные животные), повреждений лимбических структур мозга — удаление обонятельных луковиц [1, 6, 29, 51]. Важной характеристикой экспериментальных моделей является валидность, которая определяет соответствие полученных с их использованием результатов поставленным задачам. При определении адекватности, обоснованности применения экспериментальных моделей депрессии рассматривается их соответствие основ-

ным критериям валидности: возможность оценки симптомов, которые наблюдаются при заболевании у человека — наличная валидность (face validity) [4]; развитие лежащих в основе заболевания патогенетических процессов — конструктивная валидность (construct validity), из которой иногда выделяют этиологическую валидность — провоцирование событиями, которые важны для развития патологии у человека (etiological validity) [4, 15, 54]; возможность коррекции регистрируемых параметров терапевтически эффективными антидепрессантами и отсутствие изменений при применении неэффективных в клинике препаратов — предикторная валидность (predictive validity). Используется также понятие «популяционная валидность», отражающее связь генетических особенностей с развитием у животных определенных симптомов, наблюдаемых при депрессии у людей [4, 15, 27].

Поскольку ни одна из существующих экспериментальных моделей не может полностью соответствовать всем критериям валидности, признана необходимость применения для изучения патогенеза депрессии и доказательства эффективности потенциальных антидепрессантов нескольких моделей депрессивно-подобного состояния с учетом возможностей и ограничений каждой из них [10, 13, 14].

Модель «выученной беспомощности»

Одной из часто используемых стресс-индуцированных моделей депрессии является модель «выученной беспомощности» (ВБ). ВБ формируется в результате предъявления неконтролируемого авersiveного стимула, к которому животное не может приспособиться, избежать или предсказать его появление [4, 33, 55, 56]. Состояние ВБ изучается в экспериментах на животных уже более 50-ти лет. Первые эксперименты были выполнены Seligman на собаках. Животных помещали в закрытые камеры, где они получали электрошоковое раздражение лап. На следующий день проводили тестирование в установке, где было возможно избежать воздействия током, перепрыгнув через барьер. Однако более 60% животных не предпринимали никаких попыток переместиться в безопасный отсек, у них формировался фенотип выученной беспомощности [30]. Позже модель была адаптирована для грызунов [37]. Моделирование ВБ возможно как у крыс, так и у мышей, однако количество протоколов, основанных на использовании крыс в качестве объекта исследования, значительно больше, как и спектр регистрируемых признаков депрессивно-подобного состояния и соответствующих нейрохимических нарушений [3, 42, 48]. Следует отметить, что интерес к данной модели в последние годы резко возрос, что подтверждается значительным ростом количества публикаций [57].

Наиболее часто используются варианты модели с применением электрошокового раздражения лап или хвоста животных для выработки состояния ВБ с последующей оценкой депрессивно-подобного поведения в установке активного избегания. В условиях, дающих возможность избежать ударов тока, животные, у которых выработалась ВБ, либо вовсе отказываются от избегания, либо делают это со значительной задержкой. Модель ВБ оцени-

вается как имеющая достаточно высокую валидность [4, 14, 33].

Соответствие модели «выученной беспомощности» основным критериям валидности

Возможности оценки симптомов депрессии

Модель ВБ позволяет оценить входящее в симптомокомплекс депрессии состояние беспомощности, когда человек не пытается улучшить свое самочувствие, избежать отрицательных воздействий при наличии такой возможности, развивающееся в результате неконтролируемых негативных событий [48, 57]. Одним из главных преимуществ модели является когнитивная составляющая, основанная на индивидуальной интерпретации негативных событий как неконтролируемых [51]. Кроме состояния беспомощности модель позволяет регистрировать ряд других симптомов, которые хорошо коррелируют с таковыми при развитии заболеваемости у людей. Один из главных симптомов депрессии — ангедония — у крыс с ВБ проявляется снижением потребления раствора сахарозы [46]. У животных с ВБ установлено снижение массы тела, проявления симптомов ажитации, нарушения сна, снижение либидо, ассоциативно-когнитивный дефицит [16]. На модели ВБ показаны изменения структуры сна, представленности эпизодов сна с быстрыми движениями глаз (rapid eye movement, REM), характерные для эндогенной депрессии [7], увеличение времени иммобильности в тесте вынужденного плавания [52], снижение социального взаимодействия в условиях новизны [41].

Анализ литературных данных позволяет заключить, что депрессивно-подобное состояние, формируемое у крыс в модели ВБ, включает достаточно широкий спектр симптомов депрессии, которые можно регистрировать, что подтверждает соответствие модели критерию наличной валидности (face validity) [4].

Возможности изучения патогенеза депрессии

Короткое воздействие аверсивного стимула, возможно, не вполне соответствует причинам, приводящим к развитию депрессии у человека, однако фактор неконтролируемости стресса играет ключевую роль и отражает реакцию на стресс, приводящую к развитию депрессии у человека. Подтверждением адекватности модели является развитие нейрохимических и молекулярных нарушений, лежащих в основе патогенеза депрессии. В модели ВБ показано изменение уровня кортикостерона в плазме крови [12]. Получены данные об увеличении активации микроглии в гиппокампе крыс с ВБ и возможность коррекции функций микроглии антидепрессантом имипрамино, что соответствует представлениям о роли нейровоспаления в патогенезе депрессии [19]. У животных с ВБ установлены изменения экспрессии белков, участвующих в процессах нейропластичности — синопсина 1, связанного с ростом белка-43 (growth-associated protein-43) и ассоциированного с микротрубочками белка-2 (microtubule-associated protein-2) [20]. В модификация модели ВБ выявлено изменение содержания и экспрессии генов нейротрофических факторов, в частности, мозгового нейротрофического фактора (brain derived neurotrophic factor, BDNF), в разных структурах мозга [8, 42]. С использованием модели ВБ изучается роль меланин-концентрирующего гормона (МСН) в развитии депрессии и эффекты антагонистов рецепторов 1МСН как нового класса потенциальных антидепрессантов [50], ангиотензин-превращающего фермента (АПФ) и ингибиторов АПФ [25]. Модель ВБ используется в современных исследованиях роли микробиоты кишечника в развитии депрессивных расстройств. Получены данные о более высокой предрасположенности к разви-

тию состояния ВБ у крыс с нарушением состава микробиоты [59].

Таким образом, модель ВБ позволяет изучать отдельные звенья патогенеза депрессии и отвечает критерию конструктивной валидности.

Возможности оценки эффектов антидепрессантов

Преимуществом модели ВБ является то, что животные демонстрируют депрессивно-подобные симптомы, сходные с началом депрессии у человека, что позволяет оценить быстрый эффект антидепрессантов. На модели ВБ доказана эффективность трициклических антидепрессантов, селективных ингибиторов обратного захвата серотонина [24, 58], агонистов серотониновых рецепторов [21], ингибиторов MAO, электрошокового воздействия [36, 38], кетамина [40], агомелатина [9]. Применение в течение нескольких дней после выработки ВБ трициклических антидепрессантов (имипрамин, дезипрамин, amitриптилин, нортриптидин, доксепин), атипичных антидепрессантов (иприндол, миансерин), ингибиторов MAO (ипрониазид, паргалин) устраняло состояние ВБ, такой же эффект оказывало электросудорожное воздействие. В этом же исследовании установлено, что введение анксиолитиков (диазепам, лоразепам, хлордиазепоксид), нейролептиков (галоперидол, хлорпромазин), психостимуляторов (амфетамин, кофеин), фенобарбитала, этанола неэффективно в отношении устранения состояния ВБ [38]. Показано, что эффект некоторых антидепрессантов лучше проявляется в методике ВБ, чем в тесте вынужденного плавания по Порсолту [43].

Предикторная валидность модели ВБ подтверждена во многих исследованиях, показаны эффекты ряда широко используемых в клинике антидепрессантов и неэффективность препаратов, не имеющих антидепрессивной активности.

Возможности оценки генетической предрасположенности к развитию депрессии

Модель ВБ позволяет оценивать генетические варианты депрессивно-подобного поведения. Созданы линии крыс, у которых ВБ обусловлена генетически и проявляется без предшествующей выработки, — cLN (congenitally learned helpless) [16, 55].

Однако использование таких линий не всегда отвечает критериям валидности модели. Так, показано, что у крыс линии cLN отсутствует чувствительность к антидепрессантам, в ответ на острое стрессовое воздействие повышается уровень кортикостерона, но при этом не происходит изменений экспрессии BDNF, в отличие от cNLH (noncongenitally learned helpless) и Sprague-Dawley. Это позволяет предполагать, что у cLN утрачена способность к нейропластичности [47]. Создание моделей крыс с ВБ, демонстрирующих без процедуры выработки сходные с наблюдаемыми у человека при депрессии неврологические и поведенческие проявления, занимает годы, а поддержание чистоты таких линий достаточно сложно. Поэтому чаще используются коммерчески доступные линии крыс, наиболее предрасположенных к развитию ВБ, что в большей степени отвечает критериям этиологической валидности [14].

Ограничения применения модели ВБ

Различия в чувствительности

животных к выработке состояния ВБ

Неодинаковая чувствительность животных к условиям формирования состояния ВБ создает ограничения для применения модели. Есть данные, что различия могут быть даже внутри одного стока, что соответствует наличию индивидуальных различий при развитии депрессии у человека, но ограничивает воспроизводимость методики [53].

Сравнительные исследования предрасположенности крыс к выработке ВБ ведутся более 30-ти лет. В 1986 г. опубликовано исследование, в котором сравнивались результаты выработки ВБ в разных стоках аутбредных крыс самцов и у разных линий крыс. Оказалось, что аутбредные крысы Holtzman Sprague-Dawley, полученные из двух разных питомников, значительно отличаются по предрасположенности к выработке ВБ — от практически отсутствия (Sasco), до самой высокой степени — 55% (Charles River). Нечувствительность к выработке ВБ была показана у крыс линий Lewis, Brown Norway, Fisher; средняя чувствительность — линий Harlan SD и Buffalo (28% и 33%), высокая — Wistar Kyoto Holtzman (53%). При этом каких-либо различий в поведении животных контрольных групп не выявлено. Авторы указали, что в литературе публикуются обычно только высокие результаты по выработке ВБ у крыс — от 50-ти до 80%, что не отражает реальную картину воспроизводимости этой методики [53].

Значительные различия в предрасположенности к выработке ВБ описаны в сравнительном исследовании линий Holtzman, Long Evans и Sprague-Dawley. Показано, что у крыс линии Holtzman отмечается даже спонтанная ВБ, без обучения, причем такая повышенная предрасположенность выявлена только у самцов. Гендерные различия связывают с более высокой активностью самок [31].

Повышенная исследовательская активность в условиях новизны рассматривается в качестве предиктора развития ВБ, при этом повышение двигательной активности при повторной посадке в «открытое поле», напротив, коррелирует с низкой предрасположенностью к развитию ВБ [5, 32]. Получены и противоположные данные, указывающие, что неофобия коррелирует с повышенной чувствительностью к неизбежному стрессу и формированию ВБ [26].

В нашем исследовании, выполненном на белых беспородных крысах-самцах, предварительно разделенных по активности в «открытом поле», была показана предрасположенность к формированию депрессивно-подобного состояния ВБ у низкоактивных крыс [2].

Длительность сохранения состояния ВБ

Ограничением применения модели ВБ для оценки эффектов антидепрессантов считается непродолжительное сохранение депрессивно-подобного состояния [13].

Многие антидепрессанты оказывают быстрые нейрохимические эффекты, в частности, вызывают изменение уровня моноаминов, но клинические проявления обычно удается заметить только после нескольких недель или месяцев лечения, как и изменения нейропластичности. Тем не менее, на модели ВБ показан эффект фибансерина после однократного введения перед тестированием [11]; кетамина — через 24 ч и через 5 дней после однократного введения [40]; эффекты ингибитора МАО А (паргилина), ингибиторов обратного захвата серотонина (флуоксетина, пароксетина) и трициклического антидепрессанта (дезипрамина) зарегистрированы после 3-х дней введения [58]. Получены результаты, указывающие на то, что однократное предъявление неизбежного стрессорного воздействия приводит к длительным изменениям поведения и нарушениям регуляции гипоталамо-гипофизарной системы. Сохранение депрессивно-подобного состояния и соответствующих ему нейрохимических изменений в течение 7-ми дней описано при оценке антидепрессивного эффекта дезипрамина. Препарат вводили за 6 дней до выработки ВБ и 6 дней до тестирования [12]. В другом исследовании по оценке возможностей методики получены данные о сохранении состояния ВБ на 7-й и 14-й день [58]. Показано еще более длительное сохранение ВБ, до 21 дня, и возмож-

ность оценки эффектов антидепрессантов при хроническом введении [44]. В нашем исследовании у низкоактивных крыс депрессивно-подобное состояние после выработки ВБ сохранялось 16 дней [2].

Таким образом, при использовании определенного протокола исследования возможно сохранение состояния ВБ, позволяющее проводить оценку эффектов длительного введения антидепрессантов.

Варианты протоколов моделирования ВБ

Получаемые в разных научных коллективах противоречивые данные о проценте животных, у которых формируется ВБ, и сроках сохранения депрессивно-подобного состояния способствовали развитию исследований, направленных на повышение воспроизводимости модели [26, 28, 49]. В ранних исследованиях на собаках было показано, что 63% животных после предъявления неизбежного стимула через 24 ч не избегают аверсивный стимул при наличии такой возможности [30]. Для крыс описаны колебания процента животных, у которых вырабатывается ВБ, от 12,5 до 85% [28]. Такой разброс может быть обусловлен использованием не только разных линий животных, но и модификаций методики.

Ряд исследователей при формировании ВБ используют электроболевое раздражение хвоста, а тестирование проводят в установках «шатл-бокс» [22]. Выработка ВБ может также производиться либо в специальных камерах [18, 58], либо в установке «шатл-бокс», с закрытой перегородкой между отсеками [44].

При оценке длительности сохранения состояния ВБ показано, что использование одной и той же установки для выработки и тестирования способствует более продолжительному сохранению ВБ [23, 44].

Существуют различия в дизайне эксперимента. В триадном дизайне используют три группы: на этапе обучения одна группа получает аверсивный стимул с возможно-

стью избегания, сопряженная с ней группа (yoked group) получает такой же стимул, но без возможности избегания, и группа животных, которых только помещают в установку без тока. В двойном дизайне группа с возможностью избегания при формировании ВБ не включается. В этих исследованиях показано, что именно невозможность контролировать аверсивный стимул является решающим фактором развития ВБ. У животных из сопряженной группы более выражено состояние ВБ, и только у них показаны изменения содержания BDNF, характеризующие развитие депрессии [9].

При тестировании в установке «шатл-бокс» применяются различные протоколы прекращения тока: животные могут выключить ток при переходе в другой отсек (fixed ratio 1, FR1) или при повторном переходе (fixed ratio 2, FR2) [11, 28, 42]; при нажатии на педаль [34, 38, 49], поместить нос в отверстие [35], удару током может предшествовать звуковой или световой сигнал [11, 21, 35]. Определена значимость сложности процедуры прекращения тока при тестировании: так, при FR1 протоколом установлен более высокий латентный период перехода в безопасный отсек, когда животное должно было не перебежать в открытую дверцу, а перепрыгнуть через барьер. Более сложный протокол тестирования FR2 дает возможность выявить большее количество животных с ВБ [11, 44]. Показано, что усложнение алгоритма избегания тока при тестировании позволяет регистрировать состояние ВБ через 14 и даже 28 дней после выработки [18].

Разные результаты при выработке ВБ у крыс инициировали изучение влияния параметров неизбежного тока при обучении. Сравнительная оценка воздействия током разной силы (1,6 мА, 1,8 мА и 2 мА) при выработке ВБ в установке «шатл-бокс» показала, что только применение тока 1,8 мА приводит к достоверному

увеличению количества отказов от перемещения в безопасный отсек в тестовой сессии, которую проводили через 24 ч. Эту же силу тока авторы использовали для оценки эффектов предварительного повторного введения антидепрессантов [43]. Большинство исследователей считает, что применение большой силы тока с малой долей вероятности имитирует события, лежащие в основе развития депрессии, к тому же эффект от такого воздействия не сохраняется дольше двух-трех дней. Для выработки ВБ используется ток 0,65–1,5 мА, воздействие которого вызывает менее выраженные, но более продолжительные нарушения поведения [39, 42, 44, 56]. Получены данные о равной эффективности тока 0,5, 0,75 и 1,0 мА при выработке ВБ [31].

Исследования по повышению длительности сохранения депрессивно-подобного состояния показали, что в вариантах методики, когда сила тока при тестировании была ниже, чем при выработке, — 0,8 мА и 0,65 мА, соответственно, состояние ВБ регистрировалось до 21-го дня. Повышение силы тока до 1,2 мА при тестировании сокращало количество животных, у которых выявлялась ВБ [44].

Следует отметить, что в вариантах методики различаются продолжительность и критерии выработки в ВБ. Чаще оценивается количество отказов от перемещения в безопасный отсек при подаче тока [11, 44]. Например, выработку ВБ у животных проводили в течение трех дней, подвергая 20-ти ударам током силой 0,9 мА. На третий день при тестировании использовали критерий — более 10-ти отказов из 20-ти попыток [45]. Некоторые авторы устанавливают критерий развития ВБ — больше 25-ти отказов [39] или более 20-ти отказов из 30-ти попыток [19], и берут в дальнейшие эксперименты только крыс с ВБ, у которых в последующих тестированиях фиксируют средний латентный период избегания пере-

хода в безопасный отсек. Есть протоколы с критерием более 10-ти из 15-ти попыток и с альтернативным критерием — латентный период более 20 с после подачи тока, при доказанной равной значимости обоих критериев [49]. Другие исследователи регистрируют только латентный период избегания и оценивают влияние изучаемых препаратов на этот показатель у всех животных в группе, без отбора при первом тестировании [35, 38, 43]. Интересное исследование проведено по оценке информативности поведения при каждом предъявлении тока во время тестирования. На линиях крыс с генетически обусловленной ВБ и устойчивых к ВБ — congenitally helpness (cLH) и nonhelpness (cNLH), а также аутбредных показано, что чувствительность теста можно повысить, оценивая поведение только в 4-х — 10-ти предъявлениях тока при тестировании. При первых трех попытках у всех групп отмечается повышенная двигательная активность, агитация и частые случайные нажатия на педаль, а в попытках 11–15 элементы обучения сглаживают различия между группами [34]. В других работах критерием ВБ определены более 5-ти отказов из последних 10-ти предъявлений [17, 24, 38].

Таким образом, для формирования и оценки состояния ВБ у крыс использу-

ется большое количество различных протоколов, что в определенной степени обусловлено сложностями воспроизведения модели. Используются разные линии крыс, параметры тока при выработке и тестировании, различаются критерии оценки состояния ВБ. Некоторые варианты протоколов ВБ представлены в таблице.

Заключение

Модель ВБ у крыс позволяет регистрировать развитие депрессивно-подобного состояния и лежащих в его основе патогенетических процессов, оценивать эффективность антидепрессантов. С учетом большого количества вариантов протоколов и получаемых неоднозначных результатов необходима стандартизация модели ВБ в условиях каждой конкретной лаборатории. При выработке состояния ВБ и при тестировании эксперимент оптимально проводить в одной установке, не применяя электрический ток высокой интенсивности для выработки, тем более, для тестирования состояния ВБ. Следует использовать животных с наибольшей предрасположенностью к формированию ВБ.

Модель ВБ целесообразно включать в комплекс методов доклинического исследования новых потенциальных препаратов с антидепрессивной активностью.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Гарибова Т.Л., Крайнева В.А., Воронина Т.А. Поведенческие экспериментальные модели депрессии. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2017;2:14–19. [Garibova T.L., Krayneva V.A., Voronina T.A. Povedencheskiye eksperimental'nyye modeli depressii [Animal models of depression]. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2017;2:14–19. (In Russian)].
2. Котельникова С.О., Садовский М.С., Крайнева В.А., Вальдман Е.А., Середенин С.Б. Оценка предрасположенности беспородных белых крыс к формированию депрессивно-подобного состояния выученной беспомощности. *Бюлл. экп. биол. и мед.* 2020;170(8):183–187. [Kotelnikova S.O., Sadovsky M.S., Krayneva V.A., Valdman E.A., Seredenin S.B. Otsenka predispolozhenosti besporodnykh belykh krysk k formirovaniyu depressivno-podobnogo sostoyaniya vyuchennoy bespomoshchnosti [Assessment of the predisposition of outbred white rats to the formation of a depressive-like state of learned helplessness]. *Bull. Eksp. Biol. and Med.* 2020;170(8):183–187. (In Russian). DOI: 10.1007/s10517-020-05036-9.
3. Русаков Д.Ю., Вальдман А.В. Анализ острого и хронического эффекта антидепрессантов на модели депрессии поведения (“learned helplessness”) у мышей. *Бюлл. экп. биол. и мед.* 1983;96(11):62–64. [Rusakov D.Yu., Val'dman A.V. Analiz ostrogo i khronicheskogo effekta antidepressantov na modeli depressii povedeniya (“learned helplessness”) u myshy [Analysis of acute and chronic effects of anti-

Таблица. Варианты протоколов формирования и тестирования состояния выученной беспомощности у крыс
Table. Variants of protocols for the formation and testing of learned helplessness in rats

Линия крыс	Выработка ВБ			Тестирование ВБ			Источ-ник		
	Ток (мА) / кол-во ударов / дней	Контроль свет	Звук / свет	Дни после выра-ботки	Сила тока (мА)	Протокол (условный стимул (с) / ток (с) / кол-во попыток)		Условия прекращения тока	Регистрируемые параметры
Sprague Dawley	2,0/80/1	Без тока	нет	1, 7, 14	1,3	Звук (5)/45/20	Дважды перейти для прекращения тока и звука (FR2)	Латентный период перехода в FR2 протоколе, более 20 с — escape deficit, 45 с — отказ (escape failure)	[28]
Wistar	1,2/60/1	Без тока	нет	4	0,8	Свет (6)/15/25	Первые 10 — переход в другой отсек (FR1), следующие 15 — дважды перейти для прекращения тока и света (FR2)	Количество отказов от перехода в каждой попытке, только в FR2 протоколе	[11]
Wistar	1,0/60/1	Без тока	свет	1, 2	1,0	Нет/30 /30	Прыжок или помещение носа в отверстие	Латентный период до избегания тока	[35]
Sprague Dawley	0,7/20/1	Без тока	нет	5	0,8	Свет/40/15	Нажатие на педаль	Латентный период до избегания тока	[38]
Sprague Dawley	0,8/40/1	Без тока	свет	1	0,8	Свет/60/15	Нажатие на педаль	Количество отказов от избегания тока	[49]
Sprague Dawley	0,65/30/2	Без тока	нет	1, 4, 8	0,65	Звук (3)/30/30	Переход в безопасный отсек	Количество отказов от перехода. Критерий ВБ — более 25 отказов из 30 предьявлений	[39]
Sprague Dawley	0,65/30/2	Без тока	нет	1	0,65	Звук (3)/30/30	Переход в безопасный отсек	Количество отказов от перехода. Критерий ВБ — более 20 отказов из 30 предьявлений	[19]
Wistar	1,2/120/1	Без тока	нет	2, 7, 14	1,0	Свет (5)/10/30	Переход в безопасный отсек	Количество отказов от перехода	[58]
Wistar	0,8/60/1	Без тока	нет	2, 3, 4	0,8	Звук (3)/3/30	Переход в другой отсек	Количество отказов от перехода	[21]
Wistar	0,8/60/1	Без тока	нет	3, 4, 5	0,8	Свет (3)/3/30	Переход в безопасный отсек	Количество отказов от перехода	[26]
Wistar	0,8/60/1	Без тока	нет	3, 4, 5	0,8	Свет (3)/3/30	Переход в безопасный отсек	Количество отказов от перехода	[9]
Sprague Dawley	0,8/60/1	Без тока (2 дня)	звук	1, 9	0,8	Звук (3)/10/15	Переход в безопасный отсек	Количество отказов от перехода	[17]
Wistar	0,9/60/1	Без тока	нет	3, 4, 5	0,7	Звук/свет (10)/20	Переход в безопасный отсек	Количество отказов от перехода. Критерий ВБ — более 10 отказов из 20 предьявлений	[45]
Wistar	0,8/40/1	Без тока	нет	1	0,6	Звук (5)/10/30	Переход в безопасный отсек	Количество отказов от перехода	[50]

Продолжение таблицы

Линия крыс	Выработка ВБ			Тестирование ВБ			Источ-ник		
	Ток (мА) / кол-во ударов / дней	Контроль свет	Звук / свет	Дни после выработки	Сила тока (мА)	Протокол (условный стимул (с) / ток (с) / кол-во попыток)		Условия прекращения тока	Регистрируемые параметры
Sprague Dawley	0,8/100/4	Триадный дизайн*	нет	7	0,8	Звук (6)/30/30	Переход в безопасный отсек	Тестирование в течение 6 дней. Анализ уровня BDNF: анализ поведения только при выработке	[42]
Sprague Dawley	0,8/60/1	Триадный дизайн*	нет	6, 12, 21	0,65	Нет/30/30	Первые 5 — переход в другой отсек (FR1); следующие 25 — дважды перейти для прекращения тока и света (FR2)	Количество отказов от перехода	[44]
Белые беспородные	0,65/30/2	Без тока	нет	3, 14, 21	0,65	Нет/30/30	Переход в безопасный отсек	Количество отказов от перехода. Критерий ВБ — более 25 отказов из 30 предъявлений. Оценка сохранения ВБ и в тесте Порсопта	[2]

Примечание: * — в триадном дизайне используют две контрольные группы (без тока и группа с возможностью избегания тока).
 Note: * — in the triad design, two control groups are used (without current and a group with the possibility of avoiding current).

- depressive agents in a learned helplessness model in mice. *Bull. Eksp. Biol. and Med.* 1983;96(11):62–64. (In Russian)].
4. Ушакова В.М., Горлова А.В., Зубков Е.А., Морозова А.Ю., Зоркина Я.А., Павлов Д.А., Иноземцев А.Н., Чехонин В.П. Экспериментальные модели депрессивного состояния. *Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова.* 2019;2(69):230–247. [Ushakova V.M., Gorlova A.V., Zubkov Ye.A., Morozova A.Yu., Zorkina Ya.A., Pavlov D.A., Inozemtsev A.N., Chekhonin V.P. Eksperimental'nyye modeli depressivnogo sostoyaniya [Experimental models of the depressive state]. *Zhurnal vysshey nervnoy deyatelnosti im. I.P. Pavlova [J. of Higher Nervous Activity named after I.P. Pavlov].* 2019;2(69):230–247. (In Russian)].
 5. Шалыпина В.Г., Ракицкая В.В., Петрова Е.И. Роль кортикотропин-рилизинг гормона в нарушениях поведения после неизбежного стресса у активных и пассивных крыс. *Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова.* 2005;55(2):241–246. [Shalyapina V.G., Rakitskaya V.V., Petrova E.I. Rol' kortikotropin-rilizing gormona v narusheniyakh povedeniya posle neizbegaemogo stressa u aktivnykh i passivnykh kryis [The role of corticotropin-releasing hormone in behavior disorders after unavoidable stress in active and passive rats]. *Zhurnal vysshey nervnoy deyatelnosti im. I.P. Pavlova [J. of Higher Nervous Activity named after I.P. Pavlov].* 2005;55(2):241–246. (In Russian)].
 6. Яузина Н.А., Комлева Ю.К., Салмина А.Б., Петрова М.М., Морозова Г.А., Малиновская Н.А., Герцог Г.Е. Современные экспериментальные модели депрессии. *Биомедицина.* 2013;1:61–77. [Yauzina N.A., Komleva Yu.K., Salmina A.B., Petrova M.M., Morozova G.A., Malinovskaya N.A., Gertsog G.E. Sovremennyye eksperimental'nyye modeli depressii [Modern experimental models of depression. *Biomeditsina [Journal Biomed].* 2013;1:61–77. (In Russian)].
 7. Adrien J., Christine Dugovic C., Martin P. Sleep-wakefulness patterns in the helpless rat. *Physiology & Behavior.* 1991;49(2):257–262. DOI: 10.1016/0031-9384(91)90041-L.
 8. Arakawa S., Shirayama Y., Fujita Y., Ishima T., Horio M., Muneoka K., Iyo M., Hashimoto K. Minocycline produced antidepressant-like effects on the learned helplessness rats with alterations in levels of monoamine in the amygdala and no changes in BDNF levels in the hippocampus at baseline. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2012;100(3):601–606. DOI: 10.1016/j.pbb.2011.09.008.
 9. Bertaina-Angladea V., Drieu la Rochellea C., Boyerb P.A., Moeae E. Antidepressant-like effects of agomelatine (S 20098) in the learned helplessness model. *Behavioural Pharmacology.* 2006;17:703-713. DOI: 10.1097/FBP.0b013e3280116e5c.
 10. Berton O., Nestler E.J. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nat. Rev. Neurosci.* 2006;7:137–151. DOI: 10.1038/nrn1846.
 11. Borsini F., Cesana R. Mechanism of action of flibanserin in the learned helplessness paradigm in rats. *European J. of Pharmacology.* 2001;433(1):81–89. DOI: 10.1016/S0014-2999(01)01495-9.
 12. Centeno V.A., Voloshin M. Chronic treatment with desipramine: effect on endocrine and behavioral responses induced by inescapable stress. *Physiology and Behavior.* 1997;62(4):939–944. DOI: 10.1016/s0031-9384(97)00255-2.
 13. Cryan J.F., Markou A., Lucki I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends in Pharmacological Sciences.* 2002;23(5):238–245. DOI: 10.1016/s0165-6147(02)02017-5.
 14. Czéh B., Fuchs E., Wiborg O., Simon M. Animal models of major depression and their clinical implications. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 2016;4(64):293–310. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2015.04.004.
 15. Hao Y., Ge H., Sun M., Gao Y. Selecting an Appropriate Animal Model of Depression. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20:4827. DOI:10.3390/ijms20194827.
 16. Henn F.A., Vollmayr B. Stress models of depression: Forming genetically vulnerable strains. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews.* 2005;29:799–804. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2005.03.019.
 17. Ho Y.C., Wang S. Adult neurogenesis is reduced in the dorsal hippocampus of rats displaying learned helplessness behavior. *Neuroscience.* 2010;171(1):153–161. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2010.08.062.
 18. Hunziker M.H.L., Santos C.V. Learned helplessness: Effects of response requirement and interval between treatment and testing. *Behavioural Processes.* 2007;76:183–191. DOI: 10.1016/j.beproc.2007.02.012.
 19. Iwata M., Ishida H., Kaneko K., Shirayama Y. Learned helplessness activates hippocampal microglia in rats: A potential target for the antidepressant imipramine. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior.* 2016;150:138–146. DOI: 10.1016/j.pbb.2016.10.005.
 20. Iwata M., Shirayama Y., Ishida H., Kawahara R. Hippocampal synapsin I, growth-associated protein-43, and microtubule-associated protein-2 immunoreactivity in learned helplessness rats and antidepressant-treated rats. *Neuroscience.* 2006;14:1301–1313. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2006.04.060.
 21. MacSweeney C.P., Lesourd M., Gandon J.M. Antidepressant-like effects of alnespirone (S 20499) in the learned helplessness test in rats. *European Journal of Pharmacology.* 1998;345:133–137. DOI: 10.1016/S0014-2999(97)01611-7.
 22. Maier S.F. Exposure to the Stressor Environment Prevents the Temporal Dissipation of Behavioral Depression/

- Learned Helplessness. *Biol. Psychiatry*. 2001;49:763–773. DOI: 10.1016/S0006-3223(00)01095-7.
23. Maier S.F., Watkins L.R. Stressor controllability and learned helplessness: the role of the dorsal raphe nucleus, serotonin and corticotropin-releasing factor. *Neurosci. Behav. Rev.* 2005;29:829e841. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2005.03.021.
24. Malberg J.E., Duman R.S. Cell proliferation in adult hippocampus is decreased by inescapable stress: reversal by fluoxetine treatment. *Neuropsychopharmacology*. 2003;28:1562–1571. DOI:10.1038/sj.npp.1300234.
25. Martin P., Massol J., Scalbert E., Puech A.J. Involvement of angiotensin-converting enzyme inhibition in reversal of helpless behavior evoked by perindopril in rats. *European Journal of Pharmacology*. 1990;187:165–170.
26. Minor T.R., Dess N.K., Ben-David E., Chang W.C. Individual Differences in Vulnerability to Inescapable Shock in Rats. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*. 1994;20(4):402–412.
27. Mitchell P.J., Redfern P.H. Animal Models of Depressive Illness: The Importance of Chronic Drug Treatment. *Current Pharmaceutical Design*. 2005;11:171–203. DOI: 10.2174/1381612053382250.
28. Musty R.E., Jordan M.P., Lenox R.H. Criterion for learned helplessness in the rat: A redefinition. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 1990;36:739–744. DOI: 10.1016/0091-3057(90)90070-x.
29. O’Leary O.F., Cryan J.F. Towards translational rodent models of depression. *Cell Tissue Res*. 2013;354(1):141–153. DOI: 10.1007/s00441-013-1587-9.
30. Overmier J.B., Seligman M.E. Effects of inescapable shock upon subsequent escape and avoidance responding. *J. of Comparative Physiological Psychology*. 1967;63(1):28–33. DOI: 10.1037/h0024166.
31. Padilla E., Barrett D., Gonzalez-Lima F. Strain, sex, and open-field behavior: Factors underlying the genetic susceptibility to helplessness. *Behav. Brain Res*. 2009;201(2):257–264. DOI: 10.1016/j.bbr.2009.02.019.
32. Padilla E., Shumake J., Barrett D.W., Holmes G., Sheridan E.C., Gonzales-Lima F. Novelty-evoked activity in open-field predicts susceptibility to helpless behavior. *Physiology and Behavior*. 2010;101(5):746–754. DOI: 10.1016/j.physbeh.2010.08.017.
33. Pryce C.R., Azzinnari D., Spinelli S., Seifritz E., Tegethoff M., Meinschmidt G. Helplessness: A systematic translational review of theory and evidence for its relevance to understanding and treating depression. *Pharmacology & Therapeutics*. 2011;132(3):242–267. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2011.06.006.
34. Richter S.H., Sartorius A., Gass P., Vollmayr B. A matter of timing: harm reduction in learned helplessness. *Behavioral and Brain Functions*. 2014;10:41. DOI: 10.1186/1744-9081-10-41.
35. Santos C.V., Gehm T., Hunziker M.H. Learned helplessness in the rat: Effect of response topography in a within-subject design. *Behavioural Processes*. 2011;86(2):178–183. DOI: 10.1016/j.beproc.2010.11.005.
36. Sartorius A., Vollmayr B., Neumann-Haefelin C., Ende G., Hoehn M., Henn F.A. Specific creatinine rise in learned helplessness induced by electroconvulsive shock treatment. *NeuroReport*. 2003;14:2199–2201. DOI: 10.1097/00001756-200312020-00013.
37. Seligman M.E., Beagley G. Learned helplessness in the rat. *Journal of Comparative Physiological Psychology*. 1975;88(2):534–541. DOI: 10.1037/h0076430.
38. Sherman A.D., Sacquitte J.L., Petty F. Specificity of the learned helplessness model of depression. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1982;16:449–454. DOI: 10.1016/0091-3057(82)90451-8.
39. Shirayama Y., Hashimoto K. Effects of a single bilateral infusion of R-ketamine in the rat brain regions of a learned helplessness model of depression. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*. 2017;267(2):177–182. DOI: 10.1007/s00406-016-0718-1.
40. Shirayama Y., Hashimoto K. Lack of Antidepressant Effects of (2R,6R)-Hydroxynorketamine in a Rat Learned Helplessness Model: Comparison with (R)-Ketamine. *International J. of Neuropsychopharmacology*. 2018;21(1):84–88. DOI: 10.1093/ijnp/pyx108.
41. Short K.R., Maier S.F. Stressor controllability, social interaction, and benzodiazepine systems. *Pharmacol Biochem Behav*. 1993;45(4):827–835. DOI: 10.1016/0091-3057(93)90128-G.
42. Storaça A., Danielsa S., Zhou Y., Kalisch B., Parkera L., Rocka E., Limebeera C., Lapointea T., Leria F. A study of limbic brain derived neurotrophic factor gene expression in male Sprague-Dawley rats trained on a learned helplessness task. *Behav. Brain Res*. 2019;376:112174. DOI: 10.1016/j.bbr.2019.112174.
43. Takamori K., Yoshida S., Okuyama S. Availability of learned helplessness test as a model of depression compared to a forced swimming test in rats. *Pharmacology*. 2001;63:147–153. DOI: 10.1159/000056126.
44. Valentine G., Dow A., Banasr M., Pittman B., Duman R. Differential effects of chronic antidepressant treatment on shuttle box escape deficits induced by uncontrollable stress. *Psychopharmacology*. 2008;200:585–596. DOI: 10.1007/s00213-008-1239-z.
45. Velbinger K., De Vry J., Jentsch K., Eckert A., Henn F., Müller W.E. Acute stress induced modifications of calcium signaling in learned helpless rats. *Pharmacopsychiatry*. 2000;33(4):132–137. DOI: 10.1055/s-2000-11220.
46. Vollmayr B., Bachteler D., Vengeliene V., Gass P., Spanagel R., Henn F. Rats with congenital learned helplessness respond less to sucrose but show no deficits in activity or learning. *Behav. Brain Res*. 2004;150:217–221. DOI: 10.1016/S0166-4328(03)00259-6.
47. Vollmayr B., Faust H.S., Lewicka S., Henn F.A. Brain-derived-neurotrophic-factor (BDNF) stress re-

- response in rats bred for learned helplessness. *Molecular Psychiatry*. 2001;6:471–474.
48. Vollmayr B., Gass P. Learned helplessness: Unique features and translational value of a cognitive depression model. *Cell and Tissue Research*. 2013;354:171–178. DOI: 10.1007/s00441-013-1654-2.
49. Vollmayr B., Henn F.A. Learned helplessness in the rat: Improvements in validity and reliability. *Brain Research Protocols*. 2001;8:1–7. DOI: 10.1016/S1385-299X(01)00067-8.
50. Urbanavicius J., Fabius S., Roncalho A., Joca S., Torteolo P., Scorza C. Melanin-concentrating hormone in the Locus Coeruleus aggravates helpless behavior in stressed rats. *Behav. Brain Res*. 2019;18(374):112–120. DOI: 10.1016/j.bbr.2019.112120.
51. Wang Q., Matthew A., Timberlake I., Prall K., Dwivedi Y. The recent progress in animal models of depression. *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry*. 2017;77(3):99–109. DOI: /10.1016/j.pnpbp.2017.04.008.
52. Weiss J.M., Goodman P.A., Losito B.G., Corrigan S., Charry J.M., Bailey W.H. Behavioral depression produced by an uncontrollable stressor: Relationship to norepinephrine, dopamine, and serotonin levels in various regions of rat brain. *Brain Research Reviews*. 1981;3(2):167–205. DOI: 10.1016/0165-0173(81)90005-9.
53. Wieland S., Boren J.L., Consroe P.F., Martin A. Stock differences in the susceptibility of rats to learned helplessness training. *Life Sciences*. 1986;39:937–944. DOI: 10.1016/0024-3205(86)90376-0.
54. Willner P. The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology*. 1984;83(1):1–16. DOI: 10.1007/BF00427414.
55. Willner P., Belzung C. Treatment-resistant depression: are animal models of depression fit for purpose? *Psychopharmacology*. 2015;232(19):3473–3495. DOI: 10.1007/s00213-015-4034-7.
56. Willner P., Mitchell P.J. The validity of animal models of predisposition to depression. *Behavioural Pharmacology*. 2002;13:169–188. DOI: 10.1097/00008877-200205000-00001.
57. Yina X., Guvena N., Dietisa N. Stress-based animal models of depression: Do we actually know what we are doing? *Brain Research*. 2016;3042:16–52. DOI: 10.1016/j.brainres.2016.09.027.
58. Zazpe A., Artaiz I., Labeaga L., Lucero M.L., Orjales A. Reversal of learned helplessness by selective serotonin reuptake inhibitors in rats is not dependent on 5-HT availability. *Neuropharmacology*. 2007;52:975–984. DOI:10.1016/j.neuropharm.2006.10.014.
59. Zhang K., Fujita Y., Chang L., Qu Y., Pu Y., Wang S., Shirayama Y., Hashimoto K. Abnormal composition of gut microbiota is associated with resilience versus susceptibility to inescapable electric stress. *Translational Psychiatry*. 2019;9:231. DOI: 10.1038/s41398-019-0571-x.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Вальдман Елена Артуровна*, д.м.н., проф., ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»;
e-mail: evaldman@mail.ru

Elena A. Valdman, Dr. Sci. (Med.), Prof., Zakusov Institute of Pharmacology;
e-mail: evaldman@mail.ru

Крайнева Валентина Александровна, к.б.н., ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»;
e-mail: krayneva@academpharm.ru

Valentina A. Kraineva, Cand. Sci. (Biol.), Zakusov Institute of Pharmacology;
e-mail: krayneva@academpharm.ru

Котельникова Светлана Олеговна, к.б.н., ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»;
e-mail: ailantha@mail.ru

Svetlana O. Kotelnikova, Cand. Sci. (Biol.), Zakusov Institute of Pharmacology;
e-mail: ailantha@mail.ru

Садовский Максим Сергеевич, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»;
e-mail: sadowskymaxim@yandex.ru

Maksim S. Sadovsky, Zakusov Institute of Pharmacology;
e-mail: sadowskymaxim@yandex.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

О НЕОБХОДИМОСТИ И ПРЕДЕЛАХ ВИВИСЕКЦИОННЫХ ЭКСПЕРИМЕНТОВ В МЕДИЦИНЕ

А.М. Морозов^{1,*}, А.Н. Сергеев¹, С.В. Жуков¹, А.Н. Пичугова¹, М.А. Беляк¹,
А.Д. Морозова², В.Ф. Думанов³

¹ ФГБОУ ВО «Тверской государственный медицинский университет» Минздрава России
170000, Российская Федерация, Тверь, ул. Советская, 4

² ГБУЗ Тверской области «Государственная клиническая больница № 7»
170036, Российская Федерация, Тверь, Санкт-Петербургское шоссе, 76/1

³ ГБУЗ города Москвы «Московский городской научно-практический центр
борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы»
107014, Российская Федерация, Москва, ул. Стромынка, 10

Целью настоящего исследования является определение предела и возможности применения вивисекционных методов исследования в отношении лабораторных животных. Острый эксперимент как метод экспериментальной медицины широко применяется в современных научных работах и описывается во многих литературных источниках.

Существующие в настоящее время альтернативные методы познания не могут обеспечить полный отказ от использования лабораторных животных. Подходящей биомоделью для проведения доклинических испытаний и опытов остаются лабораторные животные. В настоящее время вивисекция является необходимым методом исследования, вследствие отсутствия адекватных альтернатив.

Ключевые слова: острый эксперимент, вивисекция, опыты на животных

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Морозов А.М., Сергеев А.Н., Жуков С.В., Пичугова А.Н., Беляк М.А., Морозова А.Д., Думанов В.Ф. О необходимости и пределах вивисекционных экспериментов в медицине. *Биомедицина*. 2021;17(2):35–45. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-2-35-45>

Поступила 25.11.2020

Принята после доработки 14.12.2020

Опубликована 10.06.2021

ABOUT THE NECESSITY AND LIMITS OF VIVISECTIONAL EXPERIMENTS IN MEDICINE

Artem M. Morozov^{1,*}, Aleksey N. Sergeev¹, Sergei V. Zhukov¹, Anastasija N. Pichugova¹,
Maria A. Belyak¹, Anastasia M. Morozova², Vladimir F. Dumanov³

¹ Tver State Medical University of the Ministry of Health care of Russia
170000, Russian Federation, Tver, Sovetskaya Str., 4

² State Clinical Hospital No. 7 of Tver
170036, Russian Federation, Tver, St. Petersburg Highway, 76/1

³ Moscow City Scientific and Practical Center for Tuberculosis Control
of the Moscow City Health care Department
107014, Russian Federation, Moscow, Stromynka Str., 10

The aim of this research was to study the possibilities and limits of conducting acute medical experiments from the moral and legal aspect. Modern Russian and foreign literature sources, as well as the latest sci-

entific works on the problem under study, were reviewed. It was found that acute experiments are applied in a wide range of scientific research studies. The existing alternative methods cannot abolish the use of laboratory animals. Laboratory animals remain a suitable bio-model for conducting preclinical tests and experiments. Currently, vivisection is a necessary research method due to the lack of adequate alternatives.

Keywords: acute experiment, vivisection, animal experiments

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

For citation: Morozov A.M., Sergeev A.N., Zhukov S.V., Pichugova A.N., Belyak M.A., Morozova A.M., Dumanov V.F. About the Necessity and Limits of Vivisectional Experiments in Medicine. *Journal Biomed.* 2021;17(2):35–45. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-2-35-45>

Submitted 25.11.2020

Revised 14.12.2020

Published 10.06.2021

Введение

Развитие практической и теоретической части медицинской деятельности было бы невозможно без проведения биомедицинских исследований на животных [11]. Эксперимент — это активное воздействие человека на природу и искусственное воспроизведение ее различных явлений с целью познания объективных закономерностей. В медицинской практике возможно проведение экспериментов в различной форме. Самой ранней формой является вивисекция — острый эксперимент, метод научного исследования путем оперирования животных. Проведение острого эксперимента осуществляется тремя путями: изучение физиологических особенностей органов и тканей (в их естественном положении), изучение работы изолированных или временно пересаженных органов и изучение функций организма после удаления какого-либо органа или после нарушений, произведенных в одной из систем организма [2, 19, 29].

Животные использовались в качестве объекта исследования на протяжении всей истории развития медицины. Использование животных базировалось на убеждении, что сравнительная анатомия позволит изучить анатомию человеческого тела и его физиологию. Самые ранние упоминания об опытах на животных встречаются в сочинениях II и I века

до н.э. Одними из первых, систематически проводивших опыты на живых животных, были Аристотель и Эразистрат Хиосский. Древнеримский врач II века н.э. Гален осуществлял вскрытие свиней и коз, а при проведении эксперимента на петухе, путем пересечения гортанного нерва — продемонстрировал роль последнего в голосообразовании.

Более того, первооткрыватель функций мозга и «отец нервизма» Герофил Александрийский, а также его ученик, вышеупомянутый Эразистрат Хиосский, первым описавший различия нервов и сосудов, артерий и вен, чувствительных и двигательных нервов, а также печень как орган, насосную функцию сердца и его тахикардию, почерпнули многие из этих ценные знания, выполняя вивисекцию, в т.ч. и на приговоренных к смерти людях [1, 33].

В 1977 г. впервые вышел запрет на проведение любых экспериментов на животных, в т.ч. и острого эксперимента, без обезболивания. В настоящее время опыты на животных продолжают проводиться в следующих четырех областях: тестирование лекарств — 65%, фундаментальные научные исследования (в т.ч. военные, медицинские, космические и др.) — 26%, косметология — 8%, учебный процесс — 1%. По количеству смертей животных вивисекция уступает только мясной индустрии [20, 26, 29].

Таким образом, невозможность развития медицины как прикладной науки в условиях отсутствия биомоделирования, связанного с возможным причинением страданий животным, привели к ситуации противостояния тех, кто категорически против использования животных в качестве биомоделей, и тех, кто считает необходимым осуществление четкой регуляции деятельности учёных в данной сфере [20].

Цель работы — определение предела и возможности применения вивисекционных методов исследования в отношении лабораторных животных.

Материалы и методы

Анализ современных российских и иностранных литературных источников, а также последних научных работ в области возможности проведения острого эксперимента в медицине.

Результаты и их обсуждение

Рассматривая вопрос пределов и возможности проведения вивисекционных методов исследования над лабораторными животными, необходимо понимать, что в его основе лежат этические и правовые аспекты лабораторной практики.

Прежде чем рассмотреть возможность использования животных в научных целях, опираясь на морально-правовые аспекты, необходимо обозначить, что лабораторные животные — это животные целенаправленного разведения, изначально предназначенные для научных целей, выведенные и содержащиеся в определенных условиях с понятной родословной. Согласно перечню Директивы Европейского Союза 2013/63/EU, к научным целям относятся: фундаментальные исследования, трансляционные и прикладные исследования, задачей которых является предотвращение, диагностика и лечение заболеваний человека, животных и растений, оценка, выявление,

контроль и изменение физиологических состояний человека, животных или растений, исследование и тестирование безопасности и эффективности лекарственных средств, обучение с целью приобретения, сохранения и совершенствования профессиональных навыков и др. Таким образом, видно, что спектр применения лабораторных животных, в т. ч. и с целью проведения вивисекции в качестве биомоделей, очень обширен [5, 12, 13, 14, 31].

При проведении острого эксперимента на лабораторных животных не представляется возможным избежать этического аспекта, что связано с применением в вивисекции методов недоступных и невозможных в исследованиях на человеке [8, 16, 25]. В настоящее время дилемма проведения лабораторных исследований на животных возникает на основе существования трех параллельных течений относительно данного вопроса. К таковым относятся: «антропоцентризм», «биоцентризм» и «утилитаризм». Согласно первому течению, человек рассматривается как венец мироздания и имеет полное право на использование животных в своих интересах. «Биоцентризм», напротив, говорит о сопоставимости прав животных с правами человека. Из третьего течения следует, что использование животных в экспериментальной практике можно считать обоснованным при условии достижения общественно полезной цели и пользы, превышающих ущерб, нанесенный объекту исследования. При этом иные пути достижения этой цели отсутствуют [9]. Следует отметить, что на основе представленных ниже правовых документов государственного и межгосударственного характеров можно сделать вывод, что мировое сообщество придерживается утилитаристского течения.

В 1985 г. был разработан Этический кодекс, включающий раздел «Международные рекомендации по проведению медико-биологических исследований с использованием животных». Этот документ стал одним

из первых документов нормативно-правового характера, регламентирующих права животных как объектов биомедицинских исследований, в т. ч. и с применением вивисекционных методов.

Морально-этические правила проведения экспериментов на животных отражены в «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (Страсбург, 18 марта 1986 года) и в Директиве Совета ЕС «О сближении законов, постановлений и административных положений государств ЕС по вопросам защиты животных, используемых для экспериментов и других научных целей» (86/609/ЕЕС). В указанных документах представлены основные рекомендации и требования гуманной работы с лабораторными животными, подвергающимися биомедицинскому исследованию. Каждое положение направлено на уменьшение количества используемых животных за счет применения альтернативных методов, а также запрета на такого рода исследования при отсутствии оправданной ценности полученных биологических знаний. Важным этическим аспектом применения животных как объектов исследования является снижение их страданий и боли за счет обязательного применения анальгетических и седативных препаратов. В тех случаях, когда применение данной группы лекарственных средств способно повлиять на результаты эксперимента, необходимо дополнительное согласование его проведения с этическим комитетом.

Наряду с аспектами, касающимися процедуры исследования, в регламентирующих документах установлены правила обращения с подопытными животными. Персонал, осуществляющий уход за подопытными животными, должен также обеспечивать им комфортные условия обитания. В тех случаях, когда животное по итогу исследования испытывает боль, его необходимо безболезненно умертвить [21].

С появлением идеи о защите животных, подвергающихся вивисекции, была создана «Биоэтическая концепция трёх R», которая в настоящий момент является базой всей биоэтики в отношении лабораторных животных. Данная концепция основывается на трех принципах: *replacement*, *reduction*, *refinement*. Согласно первому пункту концепции 3R необходимо не только проведение тщательного отбора подопытного животного, но и обоснование данного выбора. Принцип «*replacement*» предполагает замену высокоорганизованных видов животных более низкоорганизованными видами, замену экспериментов на животных альтернативными методами: экспериментами на культуре клеток и тканей, работой с изолированными органами, физико-химическими и биохимическими системами, экспериментами на микроорганизмах и растительных объектах, компьютерными и математическими моделями. «Фонд по замене животных в медицинских экспериментах» (Fund for Replacement of Animals in Medical Experiments — FRAME) призывает исследователей сконцентрироваться на дизайне и валидации таких альтернатив, чтобы сократить количество животных, подвергающихся различным методам исследования. В настоящее время активно идёт процесс, направленный на разработку трехмерных моделей, компьютерных программ, использования культуры тканей и трупов животных, умерших естественной смертью, что даёт возможность полностью исключить проведение вивисекции в ряде стран [10].

Принцип «*reduction*» подразумевает минимизирование используемых животных до количества, не нарушающего достоверности проводимого исследования. При этом возникает проблема необходимости использования нескольких видов животных: так, для проведения исследования токсикологической или фармакологиче-

ской безопасности нередко используются 4–6 видов, поскольку каждый подходит или не подходит для изучения тех или иных аспектов безопасности [30].

Принцип «*refinement*» диктует необходимость уменьшения дистресса, боли и страданий для животного. Кроме улучшения условий содержания лабораторных животных, это также подразумевает уменьшение дистресса во время экспериментов и применение обезболивающих средств, но не в ущерб цели эксперимента. Данное правило включает в себя представления о том, что животное не должно подвергаться боли в большей степени, чем может выдержать человек [32].

Важно отметить, что широкую поддержку во внедрении этих принципов оказал FRAME.

Кроме того, концепция 3R используется для подготовки законов по охране экспериментальных животных.

Концепция легла в основу требований FELAS (Federation of European Laboratory Animal Science Associations) по использованию животных в обучении и совершенствованию профессиональных навыков. Основной идеей является выполнение требования «*replacement*», т.е. необходимость заменить животное на искусственную модель. FELAS также предложила ввести ретроспективный отчет о лабораторных животных, обеспечивающий точный контроль за их количеством, условиями содержания и соответствием этих условий установленным требованиям [6].

Принципы гуманного отношения к животным, подвергающимся вивисекции и другим видам медицинского экспериментирования, также изложены в Руководстве [6]. Согласно выше названной монографии, учитывая принципы гуманности, необходимо тщательно подойти к выбору метода фиксации, обезболивания и последующей эвтаназии животного. В монографии также рассматриваются вопросы выбора пре-

паратов, используемых для эвтаназии и обезболивания лабораторных животных. Ни один из этапов исследования не должен приводить к развитию дистресса и болезненных ощущений у объекта исследования. В настоящее время данная работа отражает аспекты гуманного отношения с лабораторными животными на территории Российской Федерации наиболее подробно [6]. Важно отметить, что все вышеназванные требования диктуют необходимость не только в гуманном отношении внутри самого эксперимента, но и вне его. В лаборатории должны быть созданы оптимальные условия для жизни животных, налажен режим кормления, запрещено проведение вмешательств без обезболивания животных. Персонал, осуществляющий уход за животными, должен быть квалифицированным.

Огромное значение в вопросе регуляции отношения к лабораторным животным играет «Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях» [7], содержащее соответствующие международным стандартам и принципам надлежащей лабораторной практики (GLP) требования к использованию в неклинических исследованиях животных и альтернативных моделей. В работе сформулированы основы биоэтики, категорирования, контроля качества, генетического и микробиологического мониторинга, технологий содержания лабораторных животных и биобезопасности при работе с ними [35].

Все существующие на данный момент рекомендации и требования к лабораторной практике с применением лабораторных животных опираются на основы биоэтики. Тем не менее, важно отметить, что при невозможности соблюдения этических норм без риска снижения достоверности полученных в ходе эксперимента результатов, приоритетным будет являться достижение цели исследования при усло-

вии её обоснованности. В то же время встает вопрос о том, в каких случаях страдания животных в ходе вивисекции могут считаться обоснованными.

На сегодняшний день точных ответов на данный вопрос не существует, и его решение строится на основе субъективных суждений. Все указанные выше документы были приведены с целью показать, что этический аспект биомедицинских исследований волнует большое количество стран и проблема с жестоким обращением с лабораторными животными является актуальной. Тем не менее, очевидно, что документы, носящие рекомендательный характер, не гарантируют их соблюдения. Важным моментом биоэтического аспекта вивисекции является тот факт, что все приведенные выше принципы не имеют силы закона на территории Российской Федерации. Обозначив этические границы возможности использования животных как объекта исследования, в т. ч. вивисекции, необходимо обратить внимание на правовые аспекты, регулирующие данные отношения.

Российская Федерация является государством-участником директивы 2004/10/ЕС Европейского парламента и Совета от 11 февраля 2004 г. о гармонизации законов, регламентов и административных положений, касающихся применения принципов надлежащей лабораторной практики и верификации их применения к испытаниям химических веществ, в первой статье которой сказано: «государства-члены обязаны принять все необходимые меры для обеспечения соответствия лабораторий, проводящих, в соответствии с Директивой 67/548/ЕЕС, испытания химических продуктов, принципам надлежащей лабораторной практики (GLP), изложенным в дополнении I к настоящей директиве» [5]. GLP — это система качества, регламентирующая организационный процесс и условия планирования, проведения, мониторинга, документирования,

архивирования и представления результатов доклинических исследований безопасности для здоровья и окружающей среды [3, 4, 15, 17, 34]. На территории РФ эти правила являются обязательными [3, 16]. С марта 2010 г. в силу вступил национальный стандарт РФ ГОСТ Р 53434–2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики», полностью аутентичный принципам GLP/OECD. На данный момент уже разработаны базовые пакеты СОПов, которые соответствуют стандартам OECD, Международного инженерного консорциума (IEC), Международной организации по стандартизации (ISO), Комитета по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств (FDA) [7].

Тем не менее, очень важно отметить тот факт, что данная директива отражает только общие правила обращения с животными и только в доклинических исследованиях, которые являются далеко не единственной сферой, где используют лабораторных животных. При попытке же обратиться к законодательным актам различного уровня становится очевидно, что правовое регулирование данной сферы в Российской Федерации отсутствует практически полностью.

В нормативных актах Российской Федерации упоминания о животном мире встречаются в Федеральном законе «Об ответственном обращении с животными и о внесении изменений в отдельные законодательные акты Российской Федерации» от 27.12.2018 № 498-ФЗ, Федеральном законе «О животном мире» от 24.04.1995 № 52-ФЗ и УК РФ ст. 245 «Жестокое обращение с животными». При этом действие ни одного из этих нормативных документов не распространяется на эксплуатацию лабораторных животных. Так, в ФЗ «Об ответственном обращении с животными и о внесении изменений в отдельные законодательные акты Российской Федерации» сказано: «Положения настоя-

щего Федерального закона не применяются к отношениям в области охраны и использования животного мира, отношениям в области рыболовства и сохранения водных биологических ресурсов, отношениям в области аквакультуры (рыбоводства), отношениям в области охоты и сохранения охотничьих ресурсов, отношениям в области содержания и использования сельскохозяйственных животных и отношениям в области содержания и использования лабораторных животных». В ФЗ «О животном мире» и ст. 245 УК РФ упоминаний о негуманной эксплуатации лабораторных животных нет [21, 24, 25].

Неизбежно встает вопрос, каким образом осуществляется контроль за биомедицинским экспериментированием и кем устанавливаются пределы возможности применения вивисекционных методов. Очевидно, в настоящее время одна из главных ролей в этом принадлежит наблюдательным комитетам по этике (НКЭ), которые имеют полномочия одобрения или отказа в проведении различных видов медицинского экспериментирования, в т. ч. и на животных, опираясь на требования международных документов, упомянутых выше. Тем не менее, вердикт НКЭ в большинстве случаев носит лишь рекомендательный характер и не предостраивает проведение исследования [20].

В настоящее время продолжают исследования и работы по разработке методов, позволяющих полностью заменить лабораторных животных для исследований в области медицины. Однако интересным является мнение ряда ученых о том, что не только исключение, но даже ограничение возможности применения в качестве объекта эксперимента лабораторных животных в полном объеме (инбредные, гетерогенные, трансгенные, нокаутные) может не только замедлить, но и полностью остановить прогресс в познании живых систем и медицины в целом. Это

мнение подтверждается, в т. ч., несовершенством культуры клеток как биомоделей человеческого организма [34, 36]. В условиях агрессии биологических, химических и физических факторов современного мира безопасность человечества будет поставлена под угрозу [8].

Выводы

На протяжении всей истории существования медицина непрерывно развивается на благо человечества. К сожалению, методы, применяемые для достижения результата, не всегда отвечают принципам гуманности по отношению к животным. Тем не менее, прогресс в области медицины, достигнутый благодаря использованию животных в качестве объекта острого эксперимента, имеет большое значение для человечества.

В условиях современного общества, благосостояния которого на данный момент невозможно при условии прекращения использования лабораторных животных, необходимым является четкое установление пределов деятельности лабораторий, проводящих биомедицинские исследования, на законодательном уровне.

На основе информации, полученной в ходе изучения представленной в статье литературы, наглядно прослеживается тенденция ужесточения требований к проведению вивисекционных экспериментов над лабораторными животными. Однако в настоящее время однозначно можно говорить лишь об этических границах данной сферы.

Определение правовых аспектов, касающихся пределов и возможностей применения вивисекционных методов на территории Российской Федерации, является крайне затруднительным, а существующие на данный момент альтернативные методы не всегда могут полностью избавить человечество от необходимости использования животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

- Адаменко В.Н., Денисов А.В., Коровин А.Е. и др. Деонтология врача-экспериментатора: история и современность. *Российские биомедицинские исследования*. 2018;3:14–31. [Adamenko V.N., Denisov A.V., Korovin A.E., et al. Deontologija vracha-jeksperimentatora: istorija i sovremennost' [Deontology of the experimental doctor: history and modernity]. *Rossijskie biomedicinskie issledovanija [Russian biomedical research]*. 2018;3:14–31. (In Russian)].
- Берегой Н.Е. Вивисекция и борьба с ней в Российской империи в XIX — начале XX вв. *Историко-биологические исследования*. 2016;2:115–123. [Beregoj N.E. Vivisekcija i bor'ba s nej v Rossijskoj imperii v XIX — nachale XX vv. [Vivisection and the fight against it in the Russian Empire in the XIX-early XX centuries]. *Istoriko-biologicheskie issledovanija [Historical and biological research]*. 2016;2:115–123. (In Russian)].
- ГОСТ 33044-2014. Принципы надлежащей лабораторной практики [GOST 33044-2014. *Principy nadlezhashhej laboratornoj praktiki [Principles of good laboratory practice]*. (In Russian)].
- ГОСТ 33647-2015. Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP). Термины и определения [GOST 33647-2015. *Principy nadlezhashhej laboratornoj praktiki (GLP). Terminy i opredelenija. [Principles of Good Laboratory Practice (GLP). Terms and definitions]*. (In Russian)].
- Директива 2004/10/ЕС Европейского парламента и Совета от 11 февраля 2004 г. о гармонизации законов, регламентов и административных положений, касающихся применения принципов надлежащей лабораторной практики и верификации их применения к испытаниям химических веществ [Directive 2004/10/EC of the European Parliament and of the Council of 11 February 2004 on the harmonization of laws, regulations and administrative provisions concerning the application of the principles of good laboratory practice and verification of their application to chemical testing]. (In English)].
- Каркищенко Н.Н. Основы биомоделирования. М.: Изд-во ВПК, 2005:608. [Karkischenko N.N. *Osnovy biomodelirovanija [Basics of biomodelling]*. Moscow: Izd-vo VPK, 2005:608. (In Russian)].
- Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях / под ред. Н.Н. Каркищенко и С.В. Грачева. М.: Профиль-2С, 2010:358. [Rukovodstvo po laboratornym zhivotnym i al'ternativnym modeljam v biomedicinskih tehnologijah [Guide to laboratory animals and alternative models in Biomedical technologies]. Ed. by N.N. Karkischenko, S.V. Grachev. Moscow: Profil' -2С Publ., 2010:358. (In Russian)].
- Коробейникова Е.П., Комарова Е.Ф. Лабораторные животные-биомодели и тест-системы в фундаментальных и доклинических экспериментах в соответствии со стандартами надлежащей лабораторной практики (НЛП/GLP). *Журнал фундаментальной медицины и биологии*. 2016;1:30–36. [Korobejnikova E.P., Komarova E.F. Laboratornyye zhivotnyye-biomodeli i test-sistemy v fundamental'nyh i doklinicheskikh jeksperimentah v sootvetstvii so standartami nadlezhashhej laboratornoj praktiki (NLP/GLP) [Laboratory animals-biomodels and test systems in fundamental and preclinical experiments in accordance with the standards of good laboratory practice (NLP / GLP)]. *Zhurnal fundamental'noj mediciny i biologii [J. of Fundamental Medicine and Biology]*. 2016;1:30–36. (In Russian)].
- Липатов В.А., Крюков А.А., Северинов Д.А. Этические и правовые аспекты проведения экспериментальных биомедицинских исследований *in vivo*. Ч. I. *Рос. мед.-биол. вестн. им. акад. И.П. Павлова*. 2019;1:80–92. [Lipatov V.A., Krjukov A.A., Severinov D.A. Jeticcheskie i pravovye aspekty provedenija jeksperimental'nyh biomedicinskih issledovanij *in vivo*. Ch. I [Ethical and legal aspects of experimental biomedical research *in vivo*. Part I]. *Ros. med.-biol. vestn. im. akad. I.P. Pavlova. [Russian med.-biol. bulletin named after Academician I.P. Pavlov]*. 2019;1:80–92. (In Russian)].
- Лозовская А. Методология преподавания фармакологии и токсикологии с учетом новых образовательных стандартов. *VetPharma*. 2011;3–4:39–44. [Lozovskaja A. Metodologija prepodavanija farmakologii i toksikologii s uchedom novyh obrazovatel'nyh standartov [Methodology of teaching of pharmacology and toxicology, taking into account the new education standards]. *VetPharma*. 2011;3–4:39–44. (In Russian)].
- Мирецкая Е.И. Биомедицинские исследования на человеке: правовые и морально-этические проблемы. *Юридическая наука и практика: Вестник Нижегородской академии МВД России*. 2014;2(26):235–237. [Mireckaja E.I. Biomedicinskie issledovanija na cheloveke: pravovye i moral'no-jeticcheskie problem [Biomedical research in humans: legal and moral-ethical problems]. *Juridicheskaja nauka i praktika: Vestnik Nizhegorodskoj akademii MVD Rossii [Legal Science and Practice: Bulletin of the Nizhny Novgorod Academy of the Ministry of Internal Affairs of Russia]*. 2014;2(26):235–237. (In Russian)].
- Морозов А.М., Мохов Е.М., Жуков С.В., Кадьков В.А. Устройство для воспроизведения перитонита у крыс. Патент на полезную модель RU 179633 U1, 21.05.2018. [Morozov A.M., Mohov E.M., Zhukov S.V., Kadykov V.A. *Ustrojstvo dlja vosproizvedenija peritonita u krys* [Device for reproducing peritonitis in rats]. Patent for a utility model RU 179633 U1, 21.05.2018]. (In Russian)].
- Морозов А.М., Мохов Е.М., Кадьков В.А. и др. Устройство для воспроизведения перитонита у крыс. *Вестник современной клинической*

- медицины. 2019;12(1):99–102. [Morozov A.M., Mohov E.M., Kadykov V.A., et al. Ustrojstvo dlja vospriozvedenija peritonita u krys [Device for reproducing peritonitis in rats]. *Vestnik sovremennoj klinicheskoj mediciny [Bulletin of Modern Clinical Medicine]*. 2019;12(1):99–102. (In Russian)]. DOI: 10.20969/VSKM.2019.12(1):99–102.
14. Мохов А.А., Мурашев А.Н., Красильщикова М.С. О необходимости совершенствования законодательства в сфере использования лабораторных животных. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2016;4:62–68. [Mohov A.A., Murashev A.N., Krasil'shnikova M.S. O neobchodimosti sovershenstvovanija zakonodatel'stva v sfere ispol'zovanija laboratornyh zhivotnyh [On the need to improve legislation in the field of the use of laboratory animals]. *Vedomosti Nauchnogo centra jekspertizy sredstv medicinskogo primenenija [Vedomosti of the Scientific Center for the Examination of Medical Products]*. 2016;4:62–68. (In Russian)].
15. Мохов Е.М., Кадыков В.А., Морозов А.М., Елисеев М.А., Грошева А.А., Зенин Т.Т., и др. О возможности использования лабораторных животных в экспериментальной хирургии. *Хирургическая практика*. 2018;2(34):33–38. [Mohov E.M., Kadykov V.A., Morozov A.M., Eliseev M.A., Grosheva A.A., Zenin T.T., Pel'tehina O.V. O vozmozhnosti ispol'zovanija laboratornyh zhivotnyh v jekspperimental'noj hirurgii [On the possibility of using laboratory animals in experimental surgery]. *Hirurgicheskaja praktika [Surgical practice]*. 2018;2(34):33–38. (In Russian)]. DOI: 10.17238/ISSN2223-2427.2018.2.33–38.
16. Правила надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 81. [Pravila nadlezhashhej laboratornoj praktiki Evrazijskogo jekonomicheskogo sojuza v sfere obrashhenija lekarstvennyh sredstv [Rules of good laboratory practice of the Eurasian Economic Union in the field of circulation of medicines]. Decision of the Council of the Eurasian Economic Commission No. 81 of November 3, 2016.]. (In English)].
17. Правила надлежащей лабораторной практики. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 1 апреля 2016 г. № 199н. [Pravila nadlezhashhej laboratornoj praktiki [Rules of good laboratory practice]. Order of the Ministry of the Health care of Russian Federation of April 1, 2016, No. 199н]. (In Russian)].
18. Сариев О.М. Обоснованный риск в медицинской деятельности и условия его правомерности. *Вестник ТГУ*. 2015;5(145):145–151. [Sariev O.M. Obosnovannyj risk v medicinskogo dejatel'nosti i uslovija ego pravomernosti [Reasonable risk in medical activity and conditions of its legality]. *Vestnik TGU [Bulletin of Tomsk State University]*. 2015;5(145):145–151. (In Russian)].
19. Свиридов Р.В. Развитие нормы об уголовной ответственности за жестокое обращение с животными по законодательству советского периода. *Вестник Московского университета МВД России*. 2018;2:265–268. [Sviridov R.V. Razvitie normy ob ugovolnoj otvetstvennosti za zhestokoe obrashhenie s zhivotnymi po zakonodatel'stvu sovetskogo perioda [Development of the norm on criminal liability for cruelty to animals under the legislation of the Soviet period]. *Vestnik Moskovskogo universiteta MVD Rossii [Bulletin of the Moscow University of the Ministry of Internal Affairs of Russia]*. 2018;2:265–268. (In Russian)].
20. Сопкова Т.Е., Литвяк Л.Г. Уголовная ответственность за жестокое обращение с животными: теория и практика. *Евразийский Союз Ученых*. 2015;4–9(13):125–128. [Sopkova T.E., Litvjak L.G. Ugolovnaja otvetstvennost' za zhestokoe obrashhenie s zhivotnymi — teorija i praktika [Criminal liability for animal cruelty: theory and practice]. *Evrzjiskij Sojuz Uchenyh [Eurasian Union of Scientists]*. 2015;4–9(13):125–128. (In Russian)].
21. Ткаченко П.В., Липатов В.А., Привалова И.Л., Северинов Д.А., Хмаро Н.И. Этико-правовые аспекты экспериментальной практики. *Innova*. 2016;1(2):29–35. [Tkachenko P.V., Lipatov V.A., Privalova I.L., Severinov D.A., Hmaro N.I. Jetiko-pravovye aspekty jekspperimental'noj praktiki [Ethical and legal aspects of experimental practice]. *Innova*. 2016;1(2):29–35. (In Russian)].
22. Тюренков И.Н., Ломкина И.М., Куркин Д.В., Бакулин Д.А., Волотова Е.В. Этические аспекты доклинических исследований. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2015;3:36–41. [Tjurenkov I. N., Lomkina I.M., Kurkin D.V., Bakulin D.A., Volotova E.V. Jeticheskie aspekty doklinicheskikh issledovanij [Ethical aspects of preclinical research]. *Vedomosti Nauchnogo centra jekspertizy sredstv medicinskogo primenenija [Vedomosti of the Scientific Center for the Examination of Medical Products]*. 2015;3:36–41. (In Russian)].
23. Уголовный кодекс Российской Федерации от 13.06.1996 № 63-ФЗ (ред. от 31.07.2020). Ст. 245 «Жестокое обращение с животными» СЗ РФ. 13.06.1996;25. [Ugolovnyj kodeks Rossijskoj Federacii ot 13.06.1996 № 63-FZ (ed. 31.07.2020). St. 245 “Zhestokoe obrashhenie s zhivotnymi” SZ RF. [Criminal Code of the Russian Federation of 13.06.1996. No. 63-FZ. Article 245 “Cruelty to animals”]. 13.06.1996. No. 25. (In Russian)].
24. Федеральный закон от 24.04.1995 № 52-ФЗ «О животном мире». [Federal'nyj zakon ot 24.04.1995 № 52-FZ “O zhivotnom mire”. [Federal Law No. 52-FZ of 24.04.1995 “On the Animal World”]. (In Russian)].
25. Федеральный закон от 27.12.2018 № 498-ФЗ «Об ответственном обращении с животными и о внесении изменений в отдельные законодательные акты Российской Федерации». [Federal'nyj zakon ot

- 27.12.2018 № 498-FZ “Ob otvetstvennom obrashhenii s zivotnymi i o vnesenii izmenenij v otдел’nye zakonodatel’nye akty Rossijskoj Federacii”. [Federal Law No. 498-FZ of 27.12.2018 “On Responsible treatment of animals and on Amendments to Certain Legislative Acts of the Russian Federation”. (In Russian)].
26. Чадаев В.Е. Модельные объекты в медицине и ветеринарии. *Вісник проблем біології і медицини*. 2012;3:140–145. [Chadaev V.E. Model’nye ob’ekty v medicine i veterinarii [Model objects in medicine and veterinary medicine]. *Visnik problem biologii i medicini* [Bulletin of problems of Biology and Medicine]. 2012;3:140–145. (In Russian)].
27. Шагланов А.Н. Вивисекция и жестокое обращение с животными: за гранью гуманизма, права и добра. *Наука и современность*. 2011;13–3:240–246. [Shaglanov A.N. Vivisekcija i zhestokoe obrashhenie s zivotnymi: za gran’ju gumanizma, prava i dobra [Vivisection and animal cruelty: Beyond Humanism, right and Good]. *Nauka i sovremennost’* [Science and Modernity]. 2011;13–3:240–246. (In Russian)].
28. Шкурлатовская К.М., Кистенева О.А., Чернавин Д.А. История биологических экспериментов. *European research*. 2016;12(23):95–96. [Shkurlatovskaja K.M., Kisteneva O.A., Chernavin D.A. Istorija biologicheskikh jeksperimentov [History of biological experiments]. *European research*. 2016;12(23):95–96. (In Russian)].
29. Andersen M.L., Winter L.M.F. Animal models in biological and biomedical research — experimental and ethical concerns. *An. Acad. Bras. Cienc.* 2019;91:1–14. DOI: 10.1590/0001-3765201720170238.
30. Denny K.H., Stewart C.W. *Acute, subacute, subchronic, and chronic general toxicity testing for preclinical drug development: A comprehensive guide to toxicology in nonclinical drug development (second edition)*. Ed. Ali Said Faqi. London: Academic Press, 2017:109–127.
31. Directive 2010/63/EU of the European parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes.
32. Hooijmans C.R., Leenaars M., Ritskes-Hoitinga M. A gold standard publication checklist to improve the quality of animal studies, to fully integrate the Three Rs, and to make systematic reviews more feasible. *Altern. Lab. Anim.* 2010;38(2):167–182.
33. Imai M. Herophilus of Chalcedon and the Hippocratic tradition in early Alexandrian medicine. *Hist. Sci.* (Tokyo). 2011;21(2):103–122.
34. Menache A. The European citizens’ stop vivisection initiative and the revision of directive. *Altern. Lab. Anim.* 2016;44(4):383–390.
35. *OECD Series on Principles Of Good Laboratory Practice And Compliance Monitoring, Number 1. Organisation for Economic Co-operation and Development*, 1997.
36. Pearce J.M. The neuroanatomy of herophilus. *Eur. Neurol.* 2013;69(5):292–295.
37. Pollock A. Vivisection and the experiments of the physiologist. *Vesalius*. 2012;18(1):36–38.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Морозов Артем Михайлович*, к.м.н., ФГБОУ ВО «Тверской государственный медицинский университет» Минздрава России;
e-mail: ammorozovv@gmail.com

Сергеев Алексей Николаевич, д.м.н., ФГБОУ ВО «Тверской государственный медицинский университет» Минздрава России;

Жуков Сергей Владимирович, д.м.н., ФГБОУ ВО «Тверской государственный медицинский университет» Минздрава России;

Пичугова Анастасия Николаевна, ФГБОУ ВО «Тверской государственный медицинский университет» Минздрава России;

Беляк Мария Александровна, ФГБОУ ВО «Тверской государственный медицинский университет» Минздрава России;

Artem M. Morozov*, Cand. Sci. (Med.), Tver State Medical University of the Ministry of Health care of Russia;
e-mail: ammorozovv@gmail.com

Aleksey N. Sergejev, Dr. Sci. (Med.), Tver State Medical University of the Ministry of Health care of Russia;

Sergei V. Zhukov, Dr. Sci. (Med.), Tver State Medical University of the Ministry of Health care of Russia;

Anastasija N. Pichugova, Tver State Medical University of the Ministry of Health care of Russia;

Maria A. Belyak, Tver State Medical University of the Ministry of Health care of Russia;

Морозова Анастасия Дмитриевна, ГБУЗ
Тверской области «Государственная клиниче-
ская больница № 7»;

Anastasia M. Morozova, State Clinical Hospital
No. 7 of Tver;

Думанов Владимир Федорович, ГБУЗ горо-
да Москвы «Московский городской научно-
практический центр борьбы с туберкулезом
Департамента здравоохранения города Москвы»

Vladimir F. Dumanov, Moscow City Scientific
and Practical Center for Tuberculosis Control of the
Moscow City Health care Department

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

ДИНАМИКА БИОХИМИЧЕСКИХ И ЦИТОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРОВИ КРЫС ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛИМЕНТАРНОЙ МЕТИОНИН-ОБУСЛОВЛЕННОЙ ГОМОЦИСТЕИНЕМИИ

К.А. Пазиненко, Н.Н. Чучкова*, М.В. Сметанина, О.А. Пазиненко, К.Э. Пантелеев, Г.В. Иванов, Н.В. Кормилина

*ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздрава России
426056, Российская Федерация, Ижевск, ул. Коммунаров, 281*

В условиях хронической нагрузки метионином (ежедневное добавление аминокислоты в пищу (0,15 г/100 г) и воду (1% р-р)) в течение 2–12 недель наблюдали динамику показателей печеночных тестов (аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы, щелочной фосфатазы, билирубина), воспалительных изменений в крови, липидного спектра. Установлено, что метиониновая нагрузка (МН) с 4-й недели приводит к умеренной гипергомоцистеинемии ($28,9 \pm 2,65$ против $8,5 \pm 0,6$ мкмоль/л в контроле), повышению ферментов печени (АсАТ — в 1,73, АлАТ — 1,5 раза, $p < 0,05$) и билирубина (на 62,25%), что указывает на сформированную гепатопатию, которая в дальнейшем (12 недель МН) усугубляется нарушением экскреторной функции печени и холестаазом (увеличение щелочной фосфатазы в 1,65, билирубина — в 3,31 раза, $p < 0,05$). Воспалительные изменения в крови нарастают постепенно, начиная с 4-х недель введения препарата, с резким увеличением количества лейкоцитов (в 1,72 раза) и моноцитов (в 5,38 раза) к 12-й неделе МН ($p < 0,05$). Значимые изменения показателей липидного спектра у экспериментальных животных отмечаются к 12-й неделе, что сопровождается повышением индекса атерогенности в 1,49 раза ($p < 0,05$).

Ключевые слова: метиониновая нагрузка, гепатопатия, гипергомоцистеинемия, печеночные тесты, липидный спектр, моноцитоз

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Пазиненко К.А., Чучкова Н.Н., Сметанина М.В., Пазиненко О.А., Пантелеев К.Э., Иванов Г.В., Кормилина Н.В. Динамика биохимических и цитологических показателей крови крыс при моделировании хронической алиментарной метионин-обусловленной гоомоцистеинемии. *Биомедицина*. 2021;17(2): 46–57. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-2-46-57>

Поступила 14.07.2020

Принята после доработки 03.02.2021

Опубликована 10.06.2021

DYNAMICS OF BIOCHEMICAL AND CYTOLOGICAL PARAMETERS OF RAT BLOOD IN SIMULATED CHRONIC ALIMENTARY METHIONINE-INDUCED HOMOCYSTEINEMIA

Kseniya A. Pazinenko, Natalya N. Chuchkova*, Marina V. Smetanina, Oleg A. Pazinenko, Kirill E. Panteleev, Grigory V. Ivanov, Natalya V. Kormilina

*Izhevsk State Medical Academy of the Ministry of Health care of Russia
426056, Russian Federation, Izhevsk, Kommunarov Str., 281*

Under the conditions of a chronic methionine diet (daily addition of amino acids to food (0.15 g/100 g) and water (1% solution)) during 2–12 weeks, the dynamics of liver tests, inflammatory changes in the blood

and blood lipids was monitored. It was found that a methionine diet (MD) leads, starting from 4 weeks of MD, to medium hyperhomocysteinemia, an increase in liver enzymes (AsAT – 1.73, AlAT – 1.5 times, $p < 0.05$) and bilirubin (by 62.25%), which indicates the formed hepatopathy. Further (12 weeks of MD), the condition is aggravated by an abnormality of excretory liver function and the development of cholestasis (an increase in alkaline phosphatase by 1.65, bilirubin – by 3.31 times, $p < 0.05$). Inflammatory changes in the blood increase gradually, starting from 4 weeks of drug administration, with a fast growth of the number of white blood cells (1.72 times) and monocytes (5.38 times) by the 12th week of MD ($p < 0.05$). Changes in the blood lipids in experimental animals were noted by the 12th week, which was accompanied by an increase in the atherogenicity index by 1.49 times ($p < 0.05$).

Key words: methionine diet, hepatopathy, hyperhomocysteinemia, liver tests, blood lipids, monocytosis

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

For citation: Pazinenko K.A., Chuchkova N.N., Smetanina M.V., Pazinenko O.A., Panteleev K.E., Ivanov G.V., Kormilina N.V. Dynamics of Biochemical and Cytological Parameters of Rat Blood in Simulated Chronic Alimentary Methionine-Induced Homocysteinemia. *Journal Biomed.* 2021;17(2):46–57. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-2-46-57>

Submitted 14.07.2020

Revised 03.02.2021

Published 10.06.2021

Введение

Основной причиной значительного повышения уровня гомоцистеина в крови является генетически обусловленная дисфункция ферментов и кофакторов, связанных с процессом биосинтеза гомоцистеина [7, 19, 23]. Повышение гомоцистеина может быть связано также с нарушением диеты, связанной с излишним потреблением продуктов, богатых метионином (сыр, орехи, мясо, яйца, соя) [15], дефицитом фолатов, витамина В12 и, в меньшей степени, дефицитом витамина В6, что влияет на метаболизм метионина [11, 27, 32]. Гипергомоцистеинемия (ГГЦ) может сопровождать прием препаратов метионина, например, в бодибилдинге [24], где метионин является одной из самых важных аминокислот для набора мышечной массы [22, 31]. В таких случаях уровень гомоцистеина в крови редко достигает чрезмерно высоких показателей. В целом, легкая (до 15 мкмоль/л) и умеренная форма (15–30 мкмоль/л) ГГЦ встречается у 5–10% населения [23], которая считается базой для возникновения сосудистой патологии и связанных с ней заболеваний [19]. Однако эффекты гипергомоцистеинемии разнообразны, они проявляются на всех

уровнях организации организма, формируя как органную, так и системную патологию.

Уровень гомоцистеина регулируется как метиониновым, так и фолатным циклами, в связи с чем гипергомоцистеинемия может быть спровоцирована у животных как генетическими, так и диетическими манипуляциями. Поскольку гомоцистеин образуется в цитоплазме как промежуточный метаболит метионинового цикла, ГГЦ возможно вызвать созданием метаболической напряженности цикла метионина, например, путем добавления избыточного количества метионина в рацион [12].

В экспериментах на животных (в основном, это мыши, ребе — крысы, мини-пиги, утки и др.), гипергомоцистеинемию воспроизводят различными способами, используя в зависимости от цели эксперимента адекватные методологические подходы, основанные на метаболизме метионина. Так, инъекции метионина либо гомоцистеина (фармакологический подход) [5, 9, 15], внутрижелудочное введение суспензии метионина [2, 3] приводят к тяжелой форме ГГЦ. В экспериментах на мышцах показано, что умеренная гипергомоцистеинемия может быть достиг-

нута путем увеличения общего содержания метионина до 12–20 г/кг в пище [16] или воде [21]. Большинство исследований использовали протоколы кормления *ad libitum*, но некоторые использовали сравнительное парное кормление [25]. В работе [25] показано, что у мышей, получавших диету, богатую метионином, наблюдалась значительная атероматозная патология в дуге аорты даже при нормальном уровне гомоцистеина в плазме, что позволило авторам предполагать, что в основе ассоциации гомоцистеина с сосудистыми заболеваниями могут лежать продукты избыточного метаболизма метионина, а не высокий уровень гомоцистеина плазмы как такового.

Учитывая распространенность умеренной формы ГГЦ, не связанной с наследственно обусловленной патологией, мы опробовали модель формирования гипергомоцистеинемии хроническим добавлением метионина непосредственно в рацион лабораторным животным, используя различную длительность введения и анализируя эффекты, возникающие в процессе применения «метиониновой диеты».

Цель работы — формирование устойчивой гипергомоцистеинемии у экспериментальных животных пищевой нагрузкой метионином и выбор оптимальной длительности потребления метионина для изучения различных эффектов ГГЦ.

Материалы и методы

Эксперимент выполнен на 62-х белых крысах *Rattus norvegicus Berk* обоего пола, содержащихся в виварии ФГБОУ ВО ИГМА Минздрава России, в осенне-зимний период (октябрь–декабрь). Содержание животных осуществлялось в соответствии с нормативным документом СП 2.2.1.321814 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических

клиник (вивариев)» от 29 августа 2014 г. № 51.

Масса животных к началу эксперимента составляла 220 ± 20 г. Крысы находились в одинаковых условиях содержания (температура воздуха 18–22°C, относительная влажность 70%, при естественно-искусственном освещении), в клетках размером 0,6×0,4×0,5 м по 5 особей, подстилкой служили древесные опилки. Все животные получали экструдированный корм ПК-120 ГОСТ Р 51849–2001 Р.5, со свободным доступом к воде в стандартных поилках.

С целью беспрепятственного проведения экспериментальных манипуляций и исключения формирования зоостресса крыс в течение 2-х недель приручали к рукам (процедура хэндлинга [10]), затем ежедневно индивидуально каждому животному скармливали шарики из сырого свиного мясного фарша массой $15,0 \pm 0,5$ г. У контрольных животных прикорм не содержал добавок, у крыс экспериментальной группы с целью формирования гипергомоцистеинемии в фарш добавляли пищевую метионин (кормовая добавка DL-метионин 99%, Бельгия) из расчета 0,15 г/100 г, одновременно они получали 1% р-ра метионина в воде *ad libitum* в качестве питья. Выбор дозы определили данные литературы [2, 3, 16], а также предварительная самостоятельная отработка экспериментальных доз препарата. Ежедневно осуществлялось взвешивание крыс с целью корректировки дозы вводимого метионина. Распределение количества животных в группах составило: контрольная группа — 20 крыс (4 животных на момент начала эксперимента, по 4 крысы на каждую временную точку в 2, 4, 8, 12 недель эксперимента); экспериментальная группа — 42 особи: 2 недели — 10 животных, 4 недели — 12 животных, 8 недель — 10 животных, 12 недель — 10 животных.

По истечении 2, 4, 8, 12 недель метиониновой нагрузки у экспериментальных

животных и контрольных крыс под эфирным наркозом транскардиальной пункцией забирали кровь для исследования на содержание гомоцистеина, который определяли иммуноферментным методом с использованием тест-системы AxisShield (Великобритания); маркерных ферментов печени (АсАТ, АлАТ, щелочную фосфатазу, билирубин). В биохимическом анализе оценивали липидный спектр: триглицериды, общий холестерин (ОХС), холестерин липопротеинов высокой плотности (ХС ЛПВП), холестерин липопротеинов низкой плотности (ХС ЛПНП), рассчитывали индекс атерогенности по формуле: $\text{ОХС} - \text{ХС ЛПВП} / \text{ХС ЛПНП}$; общий белок крови. В клиническом анализе крови оценивали гематологические показатели белой крови (абсолютное содержание лейкоцитов, относительное (в %) количество лимфоцитов, моноцитов, гранулоцитов). Исследование проводили с использованием Olympus AU-480, System XS-500i и Alifax Roller 10 Plus. Исследование одобрено комитетом по биомедицинской этике ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздрава России. В подготовке эксперимента учитывались требования к моделированию субхронической токсичности [1], забой и взятие материала осуществлялись согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ Минвуза № 724 от 13.11.1984 г.) и Межгосударственного стандарта «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными» (2016).

В работе использовался статистический метод с применением программ «Statistica 10.0» с определением средней арифметической (M), ее ошибки (m). Результаты исследования были проверены на нормальность распределения с использованием критерия Shapiro—Wilk's. Сравнения двух групп из совокупностей анализировали с помо-

щью двухфакторного дисперсионного анализа (two-way ANOVA) с использованием программного обеспечения SPSS. Различия между группами считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследований

Метиониновая нагрузка (МН) в течение 2-х недель не вызывает значимого изменения гомоцистеина в крови (данные контрольных крыс составляют $8,5 \pm 0,6$, у экспериментальных животных — $8,9 \pm 0,8$ мкмоль/л). Уровень гомоцистеина к 4-м неделям введения метионина превышает контрольные показатели в 3,4 раза, а через 8–12 недель — в 3,55 раза ($p < 0,05$). Динамика изменений уровня гомоцистеина в крови представлена на рисунке.

Динамика печеночных тестов у животных в процессе эксперимента представлена в табл. 1.

Двухфакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA) выявил основной эффект метиониновой нагрузки на показатели: АлАТ ($F(3,79) = 38,876$, $p < 0,001$), АсАТ ($F(3,79) = 15,277$, $p < 0,001$), щелочная фосфатаза ($F(3,79) = 10,047$, $p < 0,001$), билирубин ($F(3,79) = 11,137$, $p < 0,0001$), что отражается в статистически значимом повышении указанных показателей у животных, получавших метионин, по сравнению с контролем.

Через 2 недели метиониновой нагрузки значимо в крови в 1,73 раза повышается только уровень АсАТ. Причем для этого показателя выражено увеличивается разброс данных (интервальные значения между минимальным и максимальным показателями данных). Введение метионина в течение 1-го мес. приводит к повышению также и аланиновой аминотрансферазы в 1,5 раза. К этому же времени увеличивается билирубин (в 1,62 раза). К 8-й неделе метиониновой нагрузки уровни печеночных ферментов являются наиболее значимыми: АлАТ выше контрольных значений в 2,5 раза, АсАТ — в 5,2 раза, билирубин — в 3,9 раза.

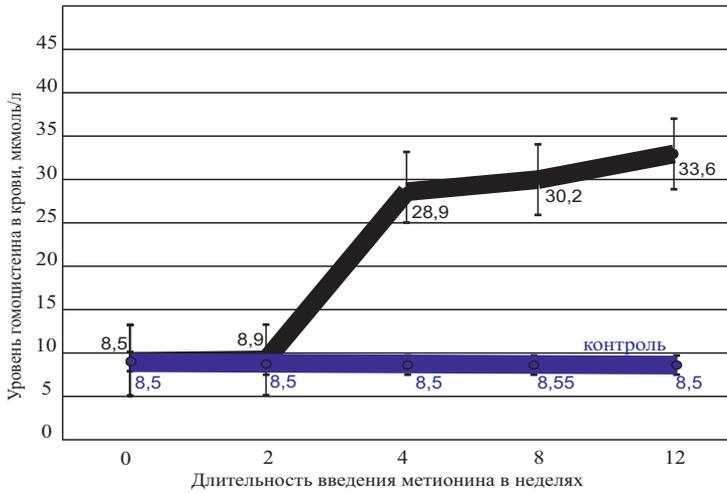


Рис. Динамика уровня гомоцистеина в крови экспериментальных животных при нагрузке метионином.
Fig. Changes in the level of homocysteine in the blood of experimental animals under a methionine diet.

Таблица 1. Динамика уровней маркерных ферментов печени и билирубина в процессе эксперимента
Table 1. Changes in the levels of liver enzymes and bilirubin during the experiment

Показатель	Единицы измерения	Интервальные значения	Среднее (М)	Ошибка среднего (m)
<i>Контрольные показатели</i>				
АлАТ	ед/л	36–82	43,56	4,88
АсАТ	ед/л	99,0–132,3	111,33	3,84
Билирубин общий	мг/дл	2,02–7,78	3,02	1,50
Щелочная фосфатаза	ед/л	162,8–259,8	238,0	15,64
<i>Длительность метиониновой нагрузки — 2 недели</i>				
АлАТ	ед/л	23,0–73,9	47,2	6,37
АсАТ	ед/л	117,0–248,8	193,1*	28,15
Билирубин общий	мг/дл	1,0–5,3	3,14	0,95
Щелочная фосфатаза	ед/л	196,1–491,0	245,5	23,32
<i>Длительность метиониновой нагрузки — 4 недели</i>				
АлАТ	ед/л	43,56–73,05	65,3*	7,70
АсАТ	ед/л	111,33–245,00	162,08*	29,17
Билирубин общий	мг/дл	1,10–6,99	4,9*	1,89
Щелочная фосфатаза	ед/л	69–418	229,5	20,56
<i>Длительность метиониновой нагрузки — 8 недель</i>				
АлАТ	ед/л	85,4–150,6	109,4*	10,22
АсАТ	ед/л	120,3–850,4	582,7*	25,62
Билирубин общий	мг/дл	4,5–13,2	11,8*	2,31
Щелочная фосфатаза	ед/л	98,2–274,4	157,1*	22,61
<i>Длительность метиониновой нагрузки — 12 недель</i>				
АлАТ	ед/л	107–144	124,32*	8,47
АсАТ	ед/л	107,0–807,6	361,15*	143,98
Билирубин общий	мг/дл	3,7–23,5	10,01*	3,97
Щелочная фосфатаза	ед/л	145–1366	393,67*	76,05

Примечание: * — различия достоверны в сравнении с показателями контроля при $p < 0,05$.
Note: * — differences are significant compared to the parameters of the control at $p < 0.05$.

К 12-й неделе МН уровень АсАТ и билирубина несколько снижается, оставаясь выше нормальных показателей, количество аланинаминотрансферазы продолжает увеличиваться. Маркером холестаза является уровень щелочной фосфатазы, наибольшее количество которой локализуется в эндотелии желчевыводящих путей. На 12-й неделе МН уровень ЩФ выше исходных значений в 1,65 раза ($p < 0,05$). Нарушение экскреторной функции печени связано с показателем билирубина — его количество через 12 недель МН

превышает данные контроля в 3,31 раза ($p < 0,05$). Одновременное повышение данных к 12-й неделе МН характеризует застой желчи, обусловленный нарушением функции клеток.

Таким образом, показатели печеночных проб (АлАТ, АсАТ, щелочная фосфатаза, билирубин) указывают на сформированную гепатопатию к 4-й неделе введения аминокислоты в рацион питания животных, которая к 12-й неделе МН дополняется нарушением экскреторной функции печени и развитием холестаза.

Таблица 2. Динамика показателей липидного спектра крови в процессе эксперимента
Table 2. Changes in blood lipids during the experiment

Показатель (ммоль/л)	Интервальные значения	Среднее (М)	Ошибка среднего (m)
<i>Контрольные показатели</i>			
Триглицериды	0,31–1,16	0,51	0,08
Общий холестерин	1,05–1,62	1,38	0,11
ХС ЛПВП	0,52–1,53	0,74	0,11
ХС ЛПНП	0,34–0,54	0,47	0,02
Индекс атерогенности	0,68–0,88	0,86	0,1
<i>Длительность метиониновой нагрузки — 2 недели</i>			
Триглицериды	0,38–0,56	0,47	0,07
Общий холестерин	0,2–1,6	1,32	0,04
ХС ЛПВП	0,70–1,95	0,82	0,21
ХС ЛПНП	0,35–0,6	0,53	0,05
Индекс атерогенности	0,66–0,81	0,71	0,1
<i>Длительность метиониновой нагрузки — 4 недели</i>			
Триглицериды	0,41–2,42	0,91*	0,17
Общий холестерин	1,1–2,1	1,51	0,13
ХС ЛПВП	0,66–0,80	0,83	0,16
ХС ЛПНП	0,36–0,68	0,52	0,14
Индекс атерогенности	0,68–0,90	0,87	0,05
<i>Длительность метиониновой нагрузки — 8 недель</i>			
Триглицериды	0,22–1,13	0,58	0,12
Общий холестерин	0,86–2,69	1,89	0,62
ХС ЛПВП	0,24–1,29	0,99*	0,13
ХС ЛПНП	0,25–0,88	0,55*	0,09
Индекс атерогенности	0,72–0,94	0,90	0,05
<i>Длительность метиониновой нагрузки — 12 недель</i>			
Триглицериды	0,21–1,20	0,68	0,12
Общий холестерин	1,32–1,83	1,64	0,09
ХС ЛПВП	0,51–1,34	0,72	0,11
ХС ЛПНП	0,21–0,50	0,31*	0,06
Индекс атерогенности	0,89–1,53	1,28*	0,09

Примечание: * — различия достоверны в сравнении с показателями контроля при $p < 0,05$.

Note: * — differences are significant compared to the parameters of the control at $p < 0.05$.

При холестатическом синдроме может повышаться уровень липидов (холестерина, триглицеридов, липопротеинов), динамика которых в процессе эксперимента представлена в табл. 2.

Двухфакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA) выявил основной эффект метиониновой нагрузки на показатель ЛПНП ($F(3,55)=2,958, p<0,05$).

При метиониновой нагрузке, продолжающейся 2–4 недели, в показателях липидного обмена значительных изменений не происходит, выявляется лишь тенденция к повышению уровней данных липидного спектра крови. Так, в сравнении с контролем на 12,76% и 10,64% повышаются ЛПНП (2-я и 4-я неделя МН), на 8,7% — общий холестерин (4-я неделя МН). Через 1 мес. в крови в 1,78 раза повышены триглицериды. Рассчитываемый на основе показателей атерогенный индекс не изменяется к этому времени ($0,87\pm 0,05$ при МН в течение 4-х недель против $0,86\pm 0,1$ у контрольных животных). Возможно, это связано с незначительным компенсаторным повышением уровня ЛПВП (на 12,16%). Практически для всех показателей (за исключением ЛПНП) на этих сроках МН повышается как верхняя, так и нижняя граница данных, при этом разбросы между максимальным и минимальным значениями менее выражены, чем у контрольных животных. Значимые (при $p<0,05$) повышения показателей липидного спектра отмечаются в 8 недель МН: общий холестерин повышается в 1,37 раза, ЛПНП — в 1,2 раза, липопротеины высокой плотности — в 1,34 раза. Увеличение длительности введения метионина до 12-ти недель сопровождается нарастающим дисбалансом в составе липидного обмена, что приводит к повышению атерогенного индекса в 1,49 раза ($1,28\pm 0,09$). Дисбаланс проявляется и в изменении интервального диапазона: у ряда животных нижняя граница показателей оказывается меньше, чем в контрольной группе.

Таким образом, незначительные изменения показателей липидного спектра у экспериментальных животных отмечаются к 8-й неделе МН, увеличиваются далее к 12-й неделе, что приводит к повышению индекса атерогенности. Двухфакторный анализ выявил значимое повышение в крови экспериментальных животных атерогенной фракции липидов (ХС ЛПНП).

Мы проследили изменение воспалительных явлений в крови, основываясь на динамике цитологических показателей в процессе эксперимента (табл. 3).

Изменения в составе белой крови появляются через 4 недели МН. Значимо ($p<0,05$) по сравнению с контрольными животными на этом сроке эксперимента увеличивается абсолютное количество лейкоцитов (на 27,43%), гранулоцитов (на 37,73%), моноцитов (в 3,05 раза). Повышены как минимальные, так и максимальные показатели. Отмечается некоторое снижение абсолютного содержания лимфоцитов — они составляют 80,78% от контрольных значений ($p<0,1$), укладываясь, тем не менее, в референсные значения. К 8-й неделе МН их количество выравнивается, оказываясь сравнимо с данными интактного контроля. У экспериментальных крыс к 8-й неделе потребления метионина с пищей остаются повышенными количество лейкоцитов и моноцитов, незначительно отличаясь от предыдущего этапа наблюдения. В дальнейшем (12 недель введения метионина) эти показатели снова повышаются: абсолютное количество лейкоцитов достоверно ($p<0,05$) превышает норму в 1,72 раза, лимфоцитов — в 1,31 раза, моноцитов — в 5,38 раза. Количество гранулоцитов выше контрольных значений на 20,32%, но не выходит за пределы референсных значений.

На 4-й неделе МН обнаруживается тенденция к повышению общего белка крови ($64,82\pm 2,52$ против $77,90\pm 2,19$ г/л), превышение показателя составляет 20,18%. В дальнейшем его количество возвраща-

Таблица 3. Динамика цитологических показателей крови в процессе эксперимента

Table 3. Changes in the cytological parameters of blood during the experiment

Показатели (10 ⁹ /л)	Интервальные значения	Среднее (М)	Ошибка среднего (m)
<i>Контрольные показатели</i>			
Лейкоциты	2,2–18,3	10,79	2,24
Гранулоциты	2,15–4,62	3,79	0,42
Лимфоциты	3,75–7,21	6,51	0,90
Моноциты	0,54–1,26	0,63	0,23
Гранулоциты (%)	21,5–46,7	35,10	4,14
Лимфоциты (%)	37,5–72,1	59,39	5,65
Моноциты (%)	6,4–23,6	6,90	1,76
<i>Длительность метиониновой нагрузки — 2 недели</i>			
Лейкоциты	8,2–12,8	9,80	2,12
Гранулоциты	1,5–3,2	2,72*	0,54
Лимфоциты	5,8–7,5	6,22	1,44
Моноциты	0,50–0,82	0,69	0,20
Гранулоциты (%)	15,5–32,2	27,74	3,21
Лимфоциты (%)	55,8–70,1	63,52	9,64
Моноциты (%)	5,2–8,4	7,01	1,56
<i>Длительность метиониновой нагрузки — 4 недели</i>			
Лейкоциты	7,8–19,8	13,75*	1,76
Гранулоциты	3,5–7,2	5,22*	1,03
Лимфоциты	4,2–5,9	5,26	0,69
Моноциты	1,2–3,1	1,92*	0,24
Гранулоциты (%)	25,8–56,9	45,25	2,53
Лимфоциты (%)	30,2–42,5	38,23	1,86
Моноциты (%)	10,5–20,1	16,04	2,42
<i>Длительность метиониновой нагрузки — 8 недель</i>			
Лейкоциты	7,9–21,1	13,10*	1,64
Гранулоциты	3,6–6,7	4,18	1,03
Лимфоциты	3,7–7,9	6,87	1,14
Моноциты	0,8–2,6	1,98*	0,17
Гранулоциты (%)	26,6–50,9	39,52	8,22
Лимфоциты (%)	28,8–68,8	50,88	5,64
Моноциты (%)	8,8–15,6	10,56	2,35
<i>Длительность метиониновой нагрузки — 12 недель</i>			
Лейкоциты	10,8–26,3	18,60*	6,65
Гранулоциты	2,4–6,7	4,56	1,56
Лимфоциты	5,8–11,1	8,51*	1,14
Моноциты	2,5–8,9	3,39*	1,01
Гранулоциты (%)	13,0–36,3	29,86	8,44
Лимфоциты (%)	48,8–84,1	55,06	10,21
Моноциты (%)	5,0–30,9	18,23	8,46

Примечание: * — различия достоверны в сравнении с показателями контроля при $p < 0,05$.

Note: * — differences are significant compared to the parameters of the control at $p < 0,05$.

ется к норме. Значительное (в несколько раз) увеличение уровня общего белка связывают с острой фазой воспаления, тогда как хроническое воспаление не является поводом для его повышения и, хотя этот фактор и является чувствительным индикатором воспаления, но не обладает специфичностью [8, 14]. Можно предположить, что в нашем случае незначительное превышение показателя маркирует начало воспалительного процесса, который в дальнейшем переходит в хроническую фазу.

Обсуждение результатов

Гомоцистеин является промежуточным метаболитом в метиониновом цикле. Согласно полученным результатам, временной точкой отсчета, с которой начинается повышение гомоцистеина, является 1 мес. после введения в рацион питания повышенных доз аминокислоты. Метионин является незаменимой аминокислотой, основные метаболические превращения которой происходят в печени (около 50% всего пищевого метионина). В ряде экспериментов по выявлению «доза—эффект» было показано, что пищевая нагрузка метионином повышает уровень ферментов печени, угнетает рост животных [28, 29, 30]. У человека модуляция количества метионина в рационе приводит к изменениям обмена веществ, нарушению метилирования гистоновых белков в клетках печени [20]. Нами отмечено, что за 4 недели избыток метионина в пище и воде инициирует развитие гепатопатии, которая приводит к нарастанию печеночных ферментов (особенно аланинаминотрансферазы), указывающих на повреждение клеток. Повреждение гепатоцитов запускает воспалительную реакцию, в которой участвует врожденная иммунная система [18, 26]. Воспалительные изменения крови (лейко- и моноцитоз) неуклонно нарастают в течение всего времени наблюдений за животными, достигая максимальных значений к 12-й неделе МН.

Воспалительный процесс у крыс с МН подтверждается также при гистологическом исследовании ткани печени формированием лейкоцитарных инфильтратов вокруг сосудов и поврежденных гепатоцитов [6], изменением кровеносного микрососудистого русла печени [4]. К 12-й неделе после введения метионина в пищу в печени выявляется нарушение экскреторной функции, развивается холестаза, что усугубляет имеющуюся гепатопатию.

Умеренная гипергомоцистеинемия на 8-й неделе МН приводит к невыраженному дисбалансу в составе липидных фракций, значимому повышению ЛПНП (проатерогенных) через 12 недель МН. Вместе с повышением атерогенных фракций липидов, в это же время повышаются (менее значительно) и антиатерогенные ЛПВП. Известно, что у крыс липиды находятся преимущественно в форме ЛПВП, у них вырабатывается мурихолевая желчная кислота, отсутствующая у людей, которая препятствует, например, апоптозу гепатоцитов, регулирует синтез желчных кислот, способствует большей устойчивости к изменениям уровня сывороточного холестерина [13, 17]. Тем не менее, стабильно повышенный уровень гомоцистеина в крови, углубление патологии печени, хроническое воспаление приводит к атеросклеротической настроенности организма, но не ранее, чем через 2 мес. после повышения уровня гомоцистеина в крови. Отмечаемый при этом в анализах крови моноцитоз является характерным для атеросклероза.

Заключение

Таким образом, последовательность анализируемых показателей и эффектов в процессе формирования умеренной гипергомоцистеинемии, обусловленной избыточным поступлением метионина с пищей, следующая: 1) повышенный метионин первично нарушает функцию клеток печени, вызы-

вая гепатопатию, следствием которой является повышение гомоцистеина в крови; 2) повышение гомоцистеина усугубляет повреждение печени, приводит далее к холестазу; способствует формированию хро-

нического воспаления; 3) более поздним временным событием является дисбаланс в составе липидов крови, нарастание атерогенных фракций и повышения индекса атерогенности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Каркищенко Н.Н. Классические и альтернативные модели в лекарственной токсикологии. *Биомедицина*. 2006;4:1–23. [Karkischenko N.N. Klassicheskie i al'ternativny'e modeli v lekarstvennoj toksikologii [Classical and alternative models in drug toxicology]. *Biomeditsina [Journal Biomed.]*. 2006;4:1–23. (In Russian)].
2. Медведев Д.В., Звягина В.И., Фомина М.А. Способ моделирования тяжелой формы гипергомоцистеинемии у крыс. *Российский медико-биологический вестник им. акад. И.П. Павлова*. 2014;22(4):42–46. [Medvedev D.V., Zvyagina V.I., Fomina M.A. Sposob modelirovaniya tyazheloy formy giperhomocisteinonii u krysov [A method of modeling a severe form of hyperhomocysteinemia in rats]. *Rossijskij mediko-biologicheskij vestnik im. akad. I.P. Pavlova [I.P. Pavlov Russian Medical Biological Herald]*. 2014;22(4):42–46. (In Russian)].
3. Новгородская Я.И., Кравчук Р.И., Островская О.Б., Курбат М.Н. Морфологические изменения в печени крыс при гипергомоцистеинемии. *Гепатология и гастроэнтерология*. 2019;3(1):93–98. [Novogrodskaya Ya.I., Kravchuk R.I., Ostrovskaya O.B., Kurbat M.N. Morfologicheskie izmeneniya v pecheni krysov pri giperhomocisteinonii [Morphological changes in the rat liver in hyperhomocysteinemia]. *Hepatology and gastroenterology*. 2019;3(1):93–98. (In Russian)].
4. Пантелеев К.Э., Пазиненко К.А., Пазиненко О.А. Метионин-индуцированная токсическая гепатопатия. *Университетская медицина Урала*. 2020;6(1):21–22. [Panteleev K.E., Pazinenko K.A., Pazinenko O.A. Metionin-inducirovannaya toksicheskaya gepatopatiya [Methionine-induced toxic hepatopathy]. *Universitetskaya medicina Urala [University medicine of the Urals]*. 2020;6(1):21–22. (In Russian)].
5. Смирнов А.В., Добронравов В.А., Невротин А.И., Хохлов С.Е., Сиповский В.Г., Барабанова В.В., Чёфу С.Г., Жлоба А.А., Блашко Э.Л. Гипергомоцистеинемия усугубляет повреждения нефрона при экспериментальной хронической почечной недостаточности. *Нефрология*. 2005;9(4):67–74. [Smirnov A.V., Dobronravov V.A., Nevrotin A.I., Khokhlov S.E., Sipovskiy V.G., Barabanova V.V., Chifu S.G., Zhloba A.A., Blashko E.L. Gipergomocisteinemiya usugublyayet povrezhdeniya nefrona pri eksperimental'noj khronicheskoy pochechnoy nedostatochnosti [Hyperhomocysteinemia exacerbates damage to the nephron in experimental chronic kidney failure]. *Nephrology*. 2005;9(4):67–74. (In Russian)].
6. Тукмачева К.А., Сметанина М.В., Чучкова Н.Н. Сравнительная оценка действия таутомеров калия оротата на активность воспалительного процесса у крыс с гипергомоцистеинемией. *Мат-лы Всеросс. науч. конф. с межд. уч. «Биология в высшей школе: актуальные вопросы науки, образования и междисциплинарной интеграции»*, Рязань, 2019:96–98. [Tukmacheva K.A., Smetanina M.V., Chuchkova N.N. Sravnitel'naya ocenka dejstviya tautomerov kaliya orotata na aktivnost' vospalitel'nogo processa u krysov s giperhomocisteinonii [Comparative evaluation of the effect of potassium orotate tautomers on the activity of the inflammatory process in rats with hyperhomocysteinemia]. *Mat-ly Vseross. nauch. konf. s mezhd. uch. «Biologiya v vysshej shkole: aktual'nye voprosy nauki, obrazovaniya i mezhdisciplinarnoj integracii [Materials of the all-Russian scientific conference with international participation "Biology in higher education: current issues of science, education and interdisciplinary integration"]*. Ryazan', 2019:96–98. (In Russian)].
7. Baeza I, Vigo L, de la Serna E, Calvo-Escalona R, Merchán-Naranjo J, Rodríguez-Latorre P, Arango C, Castro-Fornieles J. The effects of antipsychotics on weight gain, weight-related hormones and homocysteine in children and adolescents: a 1-year follow-up study. *Eur. Child Adolesc. Psychiatry*. 2017;26(1):35–46.
8. Calkosiński I, Majda J, Terlecki G, Gostomska-Pampuch K, Małolepsza-Jarmołowska K, Sobolewska S, Calkosińska A, Kumala A, Gamian A. Dynamic Analysis of Changes of Protein Levels and Selected Biochemical Indices in Rat Serum in the Course of Experimental Pleurisy. *Inflammation*. 2016;39(3):1076–1089.
9. Chaouad B, Moudilou E.N, Ghoul A, Zerrouk F, Moulahoum A, Othmani-Mecif K, Cherifi M.E.H, Exbrayat J.M, Benazzoug Y. Hyperhomocysteinemia and myocardial remodeling in the sand rat. *Psammomys obesus*. *Acta Histochem*. 2019;121(7):823–832.
10. Cloutier S, LaFollette M.R, Gaskill B.N, Panksepp J, Newberry R.C. Tickling, a technique for inducing positive affect when handling rats. *J. Vis. Exp*. 2018;(135):57190.
11. Czerwonogrodzka-Senczyna A, Jerzak M, Jeznach-Steinhagen A, Karzel K, Boniecka I. Content of fatty acids in a diet and the homocysteine levels in wom-

- en with fertility disorders. *Neuro. Endocrinol. Lett.* 2018;39(1):56–64.
12. Dayal S., Lentz S.R. Murine models of hyperhomocysteinemia and their vascular phenotypes. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2008;28(9):1596–1605.
 13. Denk G.U., Kleiss C.P., Wimmer R., Vennegeerts T., Reiter F.P., Schulz S., Zischka H., Rust C. Tauro- β -muricholic acid restricts bile acid-induced hepatocellular apoptosis by preserving the mitochondrial membrane potential. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012;424(4):758–764.
 14. Germolec D.R., Shipkowski K.A., Frawley R.P., Evans E. Markers of inflammation. *Methods Mol. Biol.* 2018;1803:57–79.
 15. Han N., Chae J.W., Jeon J., Lee J., Back H.M., Song B., Kwon K.I., Kim S.K., Yun H.Y. Prediction of Methionine and Homocysteine levels in Zucker diabetic fatty (ZDF) rats as a T2DM animal model after consumption of a Methionine-rich diet. *Nutr. Metab. (Lond.)*. 2018;15:14.
 16. Hofmann M.A., Lalla E., Lu Y., Gleason M.R., Wolf B.M., Tanji N., Ferran L.J.Jr., Kohl B., Rao V., Kisiel W., Stern D.M., Schmidt A.M. Hyperhomocysteinemia enhances vascular inflammation and accelerates atherosclerosis in a murine model. *J. Clin. Invest.* 2001;107:675–683.
 17. Hu X., Bonde Y., Eggertsen G., Rudling M. Muricholic bile acids are potent regulators of bile acid synthesis via a positive feedback mechanism. *J. Intern. Med.* 2014;275(1):27–38.
 18. Ju C., Reilly T. Role of immune reactions in drug-induced liver injury (DILI). *Drug Metab. Rev.* 2012;44(1):107–115.
 19. Kim J., Kim H., Roh H., Kwon Y. Causes of hyperhomocysteinemia and its pathological significance. *Arch. Pharm. Res.* 2018;41(4):372–383.
 20. Mentch S.J., Mehromohadi M., Huang L., Liu X., Gupta D., Mattocks D., Gómez Padilla P., Ables G., Baman M.M., Thalacker-Mercer A.E., Nichenametla S.N., Locasale J.W. Histone methylation dynamics and gene regulation occur through the sensing of one-carbon metabolism. *Cell Metab.* 2015;22(5):861–873.
 21. Mudd S.H., Skovby F., Levy H.L., Pettigrew K.D., Wilcken B., Pyeritz R.E., Andria G., Boers G.H., Bromberg I.L., Cerone R. The natural history of homocystinuria due to cystathionine β -synthase deficiency. *Am. J. Hum. Genet.* 1985;37:1–31.
 22. Seyyedin S., Nazem M.N. Histomorphometric study of the effect of methionine on small intestine parameters in rat: an applied histologic study. *Folia Morphol. (Warsz)*. 2017. doi: 10.5603/FM.a2017.0044. PMID: 28553855.
 23. Son P., Lewis L. Hyperhomocysteinemia. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publ., 2020. PMID: 32119295.
 24. Thevis M., Schänzer W. Emerging drugs affecting skeletal muscle function and mitochondrial biogenesis — Potential implications for sports drug testing programs. *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* 2016;30(5):635–651.
 25. Troen A.M., Lutgens E., Smith D.E., Rosenberg I.H., Selhub J. The atherogenic effect of excess methionine intake. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003;100:15089–15094.
 26. Tujios S., Fontana R.J. Mechanisms of drug-induced liver injury: From bedside to bench. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2011;8(4):202–211.
 27. Vadakattu S.S., Ponday L.R., Nimmathota A., Nagalla B., Kondru D.S., Undrajavarapu P., Banavath B.R., Kommula S.R., Punjal R., Palla S. Prevalence of Nutritional Anemia and Hyperhomocysteinemia in Urban Elderly. *Indian J. Clin. Biochem.* 2019;34(3):330–335.
 28. Woo C.W., Prathapasinghe G.A., Siow Y.L. Hyperhomocysteinemia induces liver injury in rat: Protective effect of folic acid supplementation. *Biochim. Biophys. Acta.* 2006;1762(7):656–665.
 29. Xu H.M., Chen Y., Xu J., Zhou Q. Drug-Induced liver injury in hospitalized patients with notably elevated alanine aminotransferase. *World J. Gastroenterol.* 2012;18(41):5972–5978.
 30. Xue J.J., Xie M., Tang J., Huang W., Zhang Q., Hou S.S. Effects of excess DL- and L-Methionine on growth performance of starter Pekin ducks. *Poult. Sci.* 2018;97(3):946–950.
 31. Yang B., Ren X.-L., Zhang J., Yu Q. Effects of training on plasma content of nitric oxide, endothelin and NO/ET system in rats fed with high methionine diet. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi.* 2011;27(2):221–224.
 32. Zaric B.L., Obradovic M., Bajic V., Haidara M.A., Jovanovic M., Isenovic E.R. Homocysteine and hyperhomocysteinemia. *Curr. Med. Chem.* 2019;26(16):2948–2961.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Пазиненко Ксения Андреевна, ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздрава России;
e-mail: k.pazinenko@yandex.ru

Чучкова Наталья Николаевна*, д.м.н., проф., ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздрава России;
e-mail: mig05@inbox.ru

Сметанина Марина Викторовна, к.м.н., ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздрава России;
e-mail: lisenok0910@rambler.ru

Пазиненко Олег Алексеевич, ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздрава России;
e-mail: pazinenko.dima@yandex.ru

Пантелеев Кирилл Эдуардович, ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздрава России;
e-mail: kirillpanteleev@mail.ru

Иванов Григорий Вадимович, ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздрава России;
e-mail: grisha-igvz@mail.ru

Кормилина Наталья Владимировна, доц., ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздрава России;
e-mail: nvkor1110@mail.ru

Kseniya A. Pazinenko, Izhevsk State Medical Academy of the Ministry of Health care of Russia;
e-mail: k.pazinenko@yandex.ru

Natalya N. Chuchkova*, Dr. Sci. (Med.), Prof., Izhevsk State Medical Academy of the Ministry of Health care of Russia;
e-mail: mig05@inbox.ru

Marina V. Smetanina, Cand. Sci. (Med.), Izhevsk State Medical Academy of the Ministry of Health care of Russia;
e-mail: lisenok0910@rambler.ru

Oleg A. Pazinenko, Izhevsk State Medical Academy of the Ministry of Health care of Russia;
e-mail: pazinenko.dima@yandex.ru

Kirill E. Panteleev, Izhevsk State Medical Academy of the Ministry of Health care of Russia;
e-mail: kirillpanteleev@mail.ru

Grigory V. Ivanov, Izhevsk State Medical Academy of the Ministry of Health care of Russia;
e-mail: grisha-igvz@mail.ru

Natalya V. Kormilina, Assoc. Prof., Izhevsk State Medical Academy of the Ministry of Health care of Russia;
e-mail: nvkor1110@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author



АКТОПРОТЕКТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ КОМБИНИРОВАННЫХ СОЕДИНЕНИЙ ДИМЕТИЛАМИНОЭТАНОЛА, СОДЕРЖАЩИХ ИНТЕРМЕДИАТЫ ЦИКЛА ТРИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ

Е.Ю. Чистякова^{1,*}, С.В. Оковитый¹, В.Н. Юсковец¹, Д.С. Лисицкий¹, А.Б. Верведа²

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

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

² ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова ФМБА России»
192019, Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, 1

Оценена актопротекторная активность некоторых комбинированных соединений диметиламиноэтанол (ДМАЭ), содержащих интермеидаты цикла трикарбонных кислот (l-малат, α-кетоглутарат, сукцинат и фумарат). Изучено влияние курсового внутривентрикулярного введения фармакологических агентов в течение 4-х недель в дозировке 75 мг/кг на показатели статической, динамической выносливости и координации движений, а также прирост массы тела «тренированных» лабораторных животных в сравнении с «эталонным» актопротектором этилтиобензимидазолом (25 мг/кг внутривентрикулярно). Спустя 1 мес. тренировок на динамическую выносливость и координацию движений наибольшее влияние оказал ДМАЭ-малат (рост на 60%, $p=0,011$), статическую выносливость повысили на 2-й неделе — ДМАЭ-малат (на 16%, $p=0,005$) и ДМАЭ-кетоглутарат (на 15,8%, $p=0,006$), на 4-й неделе — ДМАЭ-кетоглутарат (на 19,7%, $p=0,0001$) и ДМАЭ-сукцинат (на 12,2%, $p=0,003$). Выраженный прирост массы тела наблюдался в группе, получавшей ДМАЭ-кетоглутарат (на 29%, $p=0,022$). В целом, наибольшую актопротекторную активность показали комбинированные соединения диметиламиноэтанол с α-кетоглутаратом, малатом и сукцинатом.

Ключевые слова: актопротекторы, диметиламиноэтанол, сукцинат, α-кетоглутарат, малат, фумарат

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Чистякова Е.Ю., Оковитый С.В., Юсковец В.Н., Лисицкий Д.С., Верведа А.Б. Актопротекторная активность комбинированных соединений диметиламиноэтанол, содержащих интермеидаты цикла трикарбонных кислот. *Биомедицина*. 2021;17(2): 58–70. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-2-58-70>

Поступила 27.01.2021

Принята после доработки 11.03.2021

Опубликована 10.06.2021

ACTOPROTECTIVE ACTIVITY OF DIMETHYLAMINOETHANOL COMPOUNDS COMBINED WITH INTERMEDIATES OF THE CITRIC ACID CYCLE

Elizaveta Yu. Chistyakova^{1,*}, Sergey V. Okovityi¹, Valerii N. Yuskovec¹, Dmitrii S. Lisitskii¹,
Alexey B. Verveda²

¹ Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health care of Russia
197376, Russian Federation, Saint Petersburg, Professora Popova Str., 14A

² Scientific and Clinical Center of Toxicology named after Academician S.N. Golikov
of the Federal Medical and Biological Agency of Russia
192019, Russian Federation, Saint Petersburg, Bekhtereva Str., 1

The article presents the results of evaluation of actoprotective activity of combined dimethylaminoethanol compounds containing intermediates of the citric acid cycle (L-malate, α -ketoglutarate, succinate and fumarate).

The effect of long-term intragastric administration of pharmacological agents for 4 weeks at a dose of 75 mg/kg on the static, dynamic endurance, motor coordination and body weight gain of “trained” laboratory animals was assessed in comparison with reference actoprotector ethylthiobenzimidazole (25 mg/kg, intragastrically). It was found that the most promising substances for further study are alpha-ketoglutarate and succinate compounds. After 1 month of training, dynamic endurance and coordination of movements were most influenced by DMAE-malate (increase by 60%, $p=0.011$), static endurance was increased during the 2nd week by DMAE-malate (by 16%, $p=0.005$) and DMAE-ketoglutarate (by 15.8%, $p=0.006$), on the 4th week – DMAE-ketoglutarate (by 19.7%, $p=0.0001$) and DMAE-succinate (by 12.2%, $p=0.003$). A pronounced body weight increase was observed in the group receiving DMAE-ketoglutarate (by 29%, $p=0.022$). In general, combined compounds of dimethylaminoethanol with alpha-ketoglutarate, malate and succinate showed the highest actoprotective activity.

Keywords: actoprotectors, dimethylaminoethanol, succinate, α -ketoglutarate, malate, fumarate

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

For citation: Chistyakova E.Yu., Okovityi S.V., Yuskovec V.N., Lisitskii D.S., Verveda A.B. Actoprotective Activity of Dimethylaminoethanol Compounds Combined with Intermediates of the Citric Acid Cycle. *Journal Biomed.* 2021;17(2):58–70. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-2-58-70>

Submitted 27.01.2021

Revised 11.03.2021

Published 10.06.2021

Введение

Среди препаратов с актопротекторным действием одну из самых изученных групп составляют синтетические средства различных химических классов, а эталонным представителем является синтетический адаптоген этилтиобензимидазол [18]. Тем не менее, на сегодняшний день номенклатура современных актопротекторных средств крайне ограничена, несмотря на высокую потребность в них личного состава военных формирований, сотрудников МЧС, спортсменов, пациентов при различных астенических состояниях.

В качестве потенциальных средств с актопротекторной активностью большой интерес представляют производные аминоэтанола (этанолamina), обладающие широким спектром фармакологической активности, в т. ч. в отношении умственной и физической работоспособности [6, 9]. Поскольку фармакологическая коррекция процессов умственного и физического утомления имеет ряд общих принципов, то соединения, обладающие ноотропным и антиоксидантным действием, перспективны для изучения в качестве актопротекторов [11, 16, 20].

Заметной актопротекторной активностью обладают также активаторы главного энергетического механизма клеток — цикла Кребса, к которым, в частности, относятся янтарная, яблочная, фумаровая, α -кетоглутаровая кислоты и препараты их солей [7, 15]. Соответственно, соль аминокетанольного производного с интермедиатами цикла Кребса может оказывать более выраженное действие, чем исходное основание или же чистый субстрат цикла трикарбоновых кислот, за счет поддержания энергопродукции при двигательной гипоксии.

На кафедре органической химии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» были синтезированы комбинированные соединения диметиламиноэтанола (ДМАЭ), содержащие интермедиаты цикла трикарбоновых кислот (фумарат, L-малат, α -кетоглутарат и сукцинат). Предварительные исследования продемонстрировали способность некоторых из них достоверно увеличивать продолжительность плавания мышей в тесте вынужденного плавания «до отказа» [6]. Также для этих соединений была установлена антигипоксическая активность [9].

Целью данного исследования стала экспериментальная оценка актопротекторной активности фумарата, L-малата, α -кетоглутарата и сукцината диметиламиноэтанола при курсовом введении на фоне тренирующих физических нагрузок.

Материалы и методы

Исследование проведено на 84 аутобредных мышах-самцах в возрасте 3-х мес. массой 20–30 г. Животные были получены из ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово» (Ленинградская обл.). Все эксперименты выполняли в соответствии с Приказом Минздрава России от 01.04.2016 г. № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики».

Мышей содержали в стандартных условиях вивария при температуре 18–26°C со свободным доступом к воде, пище, при двенадцатичасовом цикле день/ночь.

Для исследования животные были рандомизированы по массе тела на 7 групп по 12 особей в каждой: 1-я группа — интактная; 2-я группа получала физ. р-р (отрицательный контроль); 3-я — эталонный актопротектор этилтиобензимидазол в дозировке 25 мг/кг (положительный контроль); 4-я группа — опытная — фармакологические соединения — продукты взаимодействия ДМАЭ с интермедиатами цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) в дозировке 75 мг/кг — L-малат; α -кетоглутарат (5-я группа); сукцинат (6-я группа) и фумарат (7-я группа).

Тренирующие физические нагрузки для мышей включали ежедневный принудительный бег на беговой дорожке Treadmill («TSE Systems», Германия) в течение 1 ч при скорости движения ленты 0,2 м/с и угле наклона 15° [8]. Предварительно животных постепенно приучали к нагрузке в течение 3-х дней — бег в течение 15 мин при скорости движения ленты 0,05, 0,1 и 0,15 м/с соответственно. На основании способности к бегу на беговой дорожке проводили выбраковывание животных. Животные, у которых не выработался устойчивый навык бега, были выведены из эксперимента.

Введение фармакологических агентов осуществляли внутрижелудочно при помощи зонда за 30 мин до начала тренировки в течение 1-го мес. Этилтиобензимидазол вводили сразу после окончания тренировки как средство восстанавливающего типа [18].

Для оценки координации движений и динамической выносливости в эксперименте использовали аппарат RotaRod («Ugo Basile», Италия), позволяющий моделировать повторяющиеся и значительные мышечные нагрузки при определён-

ной скорости движений [1]. Фиксировали время удержания животных на вращающемся стержне при скорости вращения 20 об./мин. Показатель оценивали перед началом тренировки — в первый день эксперимента (фон), а также спустя 2 и 4 недели тренировки. Если животное не падало в течение 5-ти мин, наблюдение прекращали. Для формирования навыка удержания на стержне животные были предварительно обучены (5 мин при скорости вращения 8 об./мин).

Оценку статической выносливости мышцей — способности длительное время сохранять статическое мышечное напряжение без признаков утомления — проводили с применением прибора для измерения силы хвата Grip Strength Meter («TSE Systems», Германия) [1]. Измеряли мышечную силу сжатия передних лап путём фиксации усилия, необходимого для того, чтобы животное разжало пальцы (грамм — сила) в трёх последовательных определениях. Показатель регистрировали перед началом нагрузок в первый день эксперимента (фон), а также спустя 2 и 4 недели тренировки.

Влияние тренировок на массу тела мышцей оценивали по показателю абсолютного прироста по сравнению с фоновым уровнем на 1–4-й неделях эксперимента.

Математико-статистический анализ результатов осуществляли с использованием пакетов Microsoft Excel 2013 и Statistica 10.0. Для анализа типа распределения использовали W критерий Шапиро—Уилка. Перед проведением дисперсионного анализа помимо оценки нормальности распределения осуществляли проверку выборок на равенство дисперсий с использованием критерия Левена.

В соответствии с полученными результатами анализа типа распределения осуществляли представление данных описательной статистики — меры центральной тенденции и показателей разброса.

Рассчитывали следующие описательные статистики количественных показателей — среднее арифметическое (Mean), стандартное отклонение (SD), медиана (Me), верхняя (UQ) и нижняя (LQ) квартили. Для асимметрично распределённых данных Mean и SD не приводили.

Для сравнения данных, не подчинявшихся закону нормального распределения, были рассчитаны непараметрические критерии. Для сравнения изучаемых показателей между двумя группами был использован U -тест Манна—Уитни (Mann—Whitney test). Для сравнения данных, подчинявшихся закону нормального распределения, для независимых выборок был использован t -критерий Стьюдента (t-test for independent samples), для несвязанных выборок — однофакторный дисперсионный анализ (One Way ANOVA). Если по результатам дисперсионного анализа устанавливались статистически значимые различия между всеми исследуемыми группами, проводили апостериорные сравнения с применением критериев Дуннета (оценка различий с контрольной группой) и Ньюмена—Кеулса (парное сравнение всех групп).

Перед применением t -критерия Стьюдента для независимых выборок (t-test for independent samples) помимо анализа нормальности распределения проводили проверку однородности дисперсий с использованием критерия Левена. В случае установления неоднородности дисперсий применяли t -критерий с раздельными оценками дисперсий и приближённым числом степеней свободы, а для оценки значимости различий — скорректированный p -уровень (p -двуст.).

В ходе исследования межгрупповых различий количественных данных проводили их оценку по отношению к базовому уровню и рассчитывали относительную величину сравнения (ОВС). При этом интервальные количественные данные преобразовывали в относительные количест-

венные данные. Для такого преобразования использовали следующую формулу:

$$OBS = [(A_1 - A_0) / A_0] \times 100\%,$$

где A_0 — значение признака в базовой группе, A_1 — значение признака в исследуемой группе.

Если результат такого преобразования являлся отрицательным числом, то знак минус опускали и констатировали более низкое значение исследуемого параметра. Если результат являлся положительным числом, то говорили о более высоком значении параметра. В качестве базовой группы в зависимости от решаемых задач выступали: интактная группа (при сравнении с контрольной), контрольная группа (при сравнении со всеми препаратами) и препарат сравнения этилтиобензимидазол (при сравнении с исследуемыми препаратами). Величина ошибки для подтверждения нулевой гипотезы была принята больше 0,05 (при $p < 0,05$ нулевую гипотезу отклоняли, а при $p > 0,05$ — принимали).

Результаты и их обсуждение

В результате проведенного исследования было установлено, что на 2-й и 4-й неделях регулярных физических нагрузок вре-

мя удержания мышей на аппарате RotaRod в контрольной группе было достоверно больше, чем в интактной группе, соответственно, в среднем на 58% ($p=0,009$) и на 131% ($p=0,005$) по медиане (табл. 1).

Изучение влияния тренировок на показатели статической выносливости животных показало, что на 2-й и 4-й неделях сила хвата в контрольной группе была достоверно больше по медиане, чем в интактной группе, соответственно, на 14% ($p=0,002$) и на 62% ($p < 0,0001$) (табл. 2).

Прирост массы тела мышей в контрольной группе был достоверно больше, чем в интактной группе, начиная с первой недели «тренировок». В среднем уровень прироста массы тела в контрольной группе превышал аналогичный показатель в интактной группе на 1–4-й неделях, соответственно, на 86% ($p=0,002$), 39% ($p=0,045$), 41% ($p=0,005$) и 33% ($p=0,004$) (табл. 3).

Таким образом, установлено, что выбранный режим тренировки вносит вклад в усиление статической и динамической выносливости, координации движений, а также прироста мышечной массы экспериментальных животных.

Интермедиаты ЦТК обладают широким спектром биологической активности [6, 15].

Таблица 1. Время удержания мышей на вращающемся стержне (с) животных интактной и контрольной групп на всех этапах исследования

Table 1. Retention time of mice on RotaRod (sec) for the intact and control groups at all stages

Этап исследования	Группа	N	Mean	SD	Me	LQ	UQ	p-уровень ¹
Фон	Интактные	12	16,4	3,2	17,5	14,0	18,5	0,779 ²
	Контроль	12	17,3	10,7	14,5	9,0	24,5	
2 недели	Интактные	12	15,8	3,6	16,0	13,5	19,0	0,009 ^{2*}
	Контроль	12	25,0	10,5	25,0	16,0	32,5	
4 недели	Интактные	12	—	—	13,0	11,0	17,5	0,005 ^{3**}
	Контроль	12	29,6	12,8	30,0	18,5	37,0	

Примечание: ¹ — значение p-уровня значимости межгрупповых различий; ² — значение p-уровня значимости по t-критерию для независимых выборок; ³ — значение p-уровня значимости по критерию Манна—Уитни; * — различия, полученные с использованием t-критерия для независимых выборок, статистически значимы ($p < 0,05$); ** — различия, полученные с использованием критерия Манна—Уитни, статистически значимы ($p < 0,05$).

Note: ¹ — p-value of the significance of differences between groups; ² — p-value of significance in the t-test for independent samples; ³ — p-value of significance in the Mann—Whitney test; * — the differences obtained using the t-test for independent samples are statistically significant ($p < 0.05$); ** — differences obtained using the Mann—Whitney test are statistically significant ($p < 0.05$).

Таблица 2. Сила хвата (грамм — сила) животных интактной и контрольной групп на всех этапах исследования
Table 2. Grip strength (gram—force) for the intact and control groups at all stages

Этап исследования	Группа	N	Mean	SD	Me	LQ	UQ	p-уровень ¹
Фон	Интактные	12	21,7	2,7	20,6	20,1	23,8	0,947 ²
	Контроль	12	21,7	1,6	21,7	20,5	22,8	
2 недели	Интактные	12	—	—	21,8	21,6	22,3	0,002 ^{3*}
	Контроль	12	24,6	1,9	24,8	23,2	26,2	
4 недели	Интактные	12	—	—	22,7	22,1	22,9	<0,0001 ^{3**}
	Контроль	12	—	—	36,8	35,3	37,3	

Примечание:¹ — значение p-уровня значимости межгрупповых различий; ² — значение p-уровня значимости по t-критерию для независимых выборок; ³ — значение p-уровня значимости по критерию Манна—Уитни; * — различия, полученные с использованием t-критерия для независимых выборок, статистически значимы (p<0,05); ** — различия, полученные с использованием критерия Манна—Уитни, статистически значимы (p<0,05).

Note:¹ — p-value of the significance of differences between groups; ² — p-value of significance in the t-test for independent samples; ³ — p-value of significance in the Mann—Whitney test; * — the differences obtained using the t-test for independent samples are statistically significant (p<0.05); ** — differences obtained using the Mann—Whitney test are statistically significant (p<0.05).

Таблица 3. Прирост массы тела мышей (г) интактной и контрольной групп на всех этапах исследования
Table 3. Increase in the body weight of mice (g) for the intact and control groups at all stages

Этап исследования	Группа	N	Mean	SD	Me	LQ	UQ	p-уровень ¹
1 неделя	Интактные	12	2,17	1,30	2,00	1,25	2,75	0,002 [*]
	Контроль	12	4,04	1,32	4,00	3,50	4,75	
2 недели	Интактные	12	4,75	1,88	4,25	3,50	5,25	0,045 [*]
	Контроль	12	6,50	2,14	6,00	5,25	7,50	
3 недели	Интактные	12	6,63	1,90	6,25	5,75	7,75	0,005 [*]
	Контроль	12	9,33	2,33	9,00	7,50	10,75	
4 недели	Интактные	12	8,96	2,06	8,75	8,00	10,25	0,004 [*]
	Контроль	12	11,88	2,32	11,75	10,50	13,50	

Примечание:¹ — значение p-уровня значимости по t-критерию для независимых выборок; * — различия, полученные с использованием t-критерия для независимых выборок, статистически значимы (p<0,05).

Note:¹ — p-value of significance in the t-test for independent samples; * — the differences obtained using the t-test for independent samples are statistically significant (p<0.05).

Известно, что яблочная, α-кетоглутаровая, янтарная кислоты и их соли, вовлекаясь в процессы образования энергии, снижают уровень молочной кислоты в крови и тканях, повышают образование глюкозы из продуктов обмена. Усиление окисления этих органических кислот — в особенности янтарной — является физиологическим приспособительным механизмом, благодаря которому повышается устойчивость к физическим нагрузкам [7].

При оценке влияния исследуемых соединений на координацию движений и динамическую выносливость достоверные различия между исследуемыми группами

по показателю время удержания на RotaRod с использованием дисперсионного анализа (p=0,041) были выявлены только через 4 недели «тренировок» (табл. 4).

Апостериорное сравнение с применением критерия Дуннета показало, что после введения ДМАЭ-малата время удержания животных на вращающемся стержне на 4-й неделе было достоверно выше, чем в контрольной группе, на 61% (p=0,011). Введение остальных препаратов также увеличивало время удержания, однако уровень различий с группой контроля был статистически не значим. Р-уровни апостериорных сравнений с использованием критерия

Таблица 4. Время удержания на вращающемся стержне (с) животных исследуемых групп на 4-й неделе исследования

Table 4. Retention time of mice on RotaRod (sec.) for the intact and control groups at the 4th week of the study

Этап исследования	Группа	Значения переменной			p-уровень межгрупповых различий ¹	p-уровень парных межгрупповых различий ²
		N	Mean	SD		
4 неделя	Контрольная	12	29,6	12,8	0,041*	—
	Этилтиобензимидазол	12	42,8	8,3		0,095
	ДМАЭ-малат	12	47,6	15,0		0,011**
	ДМАЭ-кетоглутарат	12	44,1	9,5		0,055
	ДМАЭ-сукцинат	12	43,6	13,7		0,068
	ДМАЭ-фумарат	12	38,0	20,9		0,445

Примечание:¹ — значение p-уровня значимости в One Way ANOVA;² — значение p-уровня значимости при сравнении с использованием критерия Дуннета (апостериорное сравнение с контрольной группой); * — различия, полученные с использованием One Way ANOVA, статистически значимы (p<0,05); ** — различия, полученные с использованием критерия Дуннета, статистически значимы (p<0,05).

Note:¹ — p-value of the significance in One Way ANOVA;² — p-value of significance in the Dunnett test (a posteriori comparison with the control group); * — differences obtained using One Way ANOVA are statistically significant (p<0.05); ** — differences obtained using the Dunnett test are statistically significant (p<0.05).

Ньюмана—Кеулса после введения всех исследуемых препаратов превышали уровень значимости (0,05), что свидетельствовало об отсутствии значимых различий между исследуемыми препаратами по данному показателю.

Яблочная кислота и её соли являются регуляторами энергетики мышечной деятельности. О положительном влиянии малата на физическую работоспособность, особенно в период восстановления после истощающих нагрузок, сообщалось в работах различных авторов [19, 23]. Малат, среди прочего, вовлекается в работу малат-аспартатной челночной системы, каждые 2 цикла которой обеспечивают синтез 5 молекул АТФ в мышечных тканях.

В проведённом исследовании наблюдали рост динамической выносливости в группе ДМАЭ-малат к 4-й неделе исследования. Возможная причина такого изменения — постепенное включение в работу малат-аспартатной челночной системы; при этом малат антипортом с α-кетоглутаратом проникает в митохондрии и, являясь метаболитом ЦТК, окисляется в оксалоацетат с образованием НАДН. Кроме того, малатдегидрогеназа, переводящая малат в оксалоацетат, высокочувствительна к утомле-

нию и регулируется уровнем малата [5]. Во-вторых, вероятно, малат может способствовать утилизации лактата, накапливающегося в скелетных мышцах во время тренировок, что очень важно для защиты мышц от усталости и их восстановления после нагрузок. Так, известно, что малат через оксалоацетат в цитозоле клетки превращается в фосфоенолпируват. Данный механизм служит обходным путём в глюконеогенезе и направлен на ресинтез АТФ. Также в ряде работ отмечается участие малата в биохимической адаптации организма к гипоксии, т.к. образующийся НАДФН в результате реакции малат-оксалоацетат используется глутатионредуктазной/глутатионпероксидазной ферментной антиоксидантной системой [19, 23].

Динамическая выносливость — способность мышц к выполнению среднеинтенсивной работы без утомления на протяжении небольшого отрезка времени, главным образом связана с фенотипом, т.е. с наличием воздействия со стороны окружающей среды — тренировками [3]. Таким образом, чем сильнее развиты скелетные мышцы, тем лучше тренируется данный вид выносливости. Следовательно, ДМАЭ-малат создал условия для тренировки мышц

животных и оптимизировал процессы их утомления и восстановления.

Дисперсионный анализ силы хвата продемонстрировал достоверные отличия между исследуемыми группами на 2-й ($p=0,001$) и 4-й ($p<0,0001$) неделях после начала тренировок (табл. 5). На 2-й неделе после начала введения ДМАЭ-малата и ДМАЭ-кетоглутарата уровень статической мышечной выносливости был достоверно выше, чем в контрольной группе, со-

ответственно, на 16,2% ($p=0,005$) и 15,8% ($p=0,006$).

Через 2 недели тренировок наименьшее влияние на статическую мышечную выносливость оказали этилтиобензимидазол, ДМАЭ-фумарат и ДМАЭ-сукцинат (на уровне контрольных значений), в противоположность группам, получавшим ДМАЭ-малат и ДМАЭ-кетоглутарат, которые продемонстрировали достоверное увеличение исследуемого показателя (табл. 6).

Таблица 5. Сила хвата животных (грамм — сила) исследуемых групп на 2-й и 4-й неделях исследования
Table 5. Grip strength of mice (gram — force) at the 2nd and 4th weeks of the study

Этап исследования	Группа	Значения переменной			р-уровень межгрупповых различий ¹	р-уровень парных межгрупповых различий ²
		N	Mean	SD		
2-я неделя	Контрольная	12	24,6	1,9	0,001*	—
	Этилтиобензимидазол	12	24,7	4,5		1,000
	ДМАЭ-малат	12	28,6	1,6		0,005**
	ДМАЭ-кетоглутарат	12	28,5	1,0		0,006**
	ДМАЭ-сукцинат	12	26,8	3,6		0,237
	ДМАЭ-фумарат	12	25,3	3,2		0,964
4-я неделя	Контрольная	12	36,0	2,2	<0,0001*	—
	Этилтиобензимидазол	12	38,2	1,2		0,247
	ДМАЭ-малат	12	37,8	1,0		0,435
	ДМАЭ-кетоглутарат	12	43,1	5,7		<0,0001**
	ДМАЭ-сукцинат	12	40,4	2,4		0,003**
	ДМАЭ-фумарат	12	36,9	2,8		0,909

Примечание:¹ — значение р-уровня значимости в One Way ANOVA;² — значение р-уровня значимости при сравнении с использованием критерия Дуннета (апостериорное сравнение с контрольной группой); * — различия, полученные с использованием One Way ANOVA, статистически значимы ($p<0,05$); ** — различия, полученные с использованием критерия Дуннета, статистически значимы ($p<0,05$).

Note:¹ — p-value of the significance in One Way ANOVA;² — p-value of significance in the Dunnett test (a posteriori comparison with the control group); * — differences obtained using One Way ANOVA are statistically significant ($p<0,05$); ** — differences obtained using the Dunnett test are statistically significant ($p<0,05$).

Таблица 6. Квадратичная матрица апостериорных сравнений исследуемых соединений через 2 недели с использованием критерия Ньюмана—Кеулса

Table 6. Quadratic matrix of a posteriori comparisons of the studied compounds after 2 weeks using the Newman—Keuls test

Препарат	Этилтиобензимидазол	ДМАЭ-малат	ДМАЭ-кетоглутарат	ДМАЭ-сукцинат	ДМАЭ-фумарат
Этилтиобензимидазол	—	0,023*	0,016*	0,225	0,633
ДМАЭ-малат	0,023*	—	0,988	0,324	0,051
ДМАЭ-кетоглутарат	0,016*	0,988	—	0,158	0,030*
ДМАЭ-сукцинат	0,225	0,324	0,158	—	0,239
ДМАЭ-фумарат	0,633	0,051	0,030*	0,239	—

Примечание: * — различия для препарата в строке статистически значимы по сравнению с препаратом, представленном в соответствующем столбце ($p<0,05$).

Note: * — the differences for the drug in the row are statistically significant in comparison with the drug presented in the corresponding column ($p<0,05$).

При использовании критерия Дуннета достоверные различия по сравнению с группой контроля на 4-й неделе были установлены для ДМАЭ-кетоглутарата и ДМАЭ-сукцината, которые превышали контрольный уровень соответственно на 20% ($p < 0,0001$) и 12% ($p = 0,003$) (табл. 7). Статическая мышечная выносливость животных после курса введения ДМАЭ-кетоглутарата и ДМАЭ-сукцината была достоверно выше по сравнению с остальными соединениями, включая этилтиобензимидазол.

Янтарная кислота — промежуточный продукт цикла Кребса, принимающий участие в энергопродукции в клетках организма. При участии кофермента флавинадениндуклеотида (ФАД) янтарная кислота быстро трансформируется митохондриальным ферментом сукцинатдегидрогеназой в фумаровую кислоту и далее в другие интермедиаты ЦТК. Сукцинаты стимулируют аэробный гликолиз и синтез аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ) в клетках. Также улучшают тканевое дыхание за счёт активации транспорта электронов в митохондриях [2].

α -кетоглутарат (АКГ) является важной биомолекулой, которая играет ключевую роль во множестве метаболических путей. В качестве интермедиата цикла Кребса он координирует работу других его субстратов,

тем самым регулируя синтез аминокислот, производство АТФ, уровни активных форм кислорода. АКГ также является обязательным субстратным кофактором для ряда ферментов, которые катализируют реакции гидроксирования различных типов субстратов, включая белки, нуклеиновые кислоты, липиды и т.д. АКГ также оказывает влияние на пролил/аспартил/лизил гидроксирование, что, в свою очередь, регулирует стабильность индуцируемого гипоксией фактора (HIF-1) и синтез коллагена [14, 24].

Т.к. статическая выносливость связана с удержанием рабочего напряжения в определенной позе, во многом связана с генотипом и требует значительного вмешательства в работу мышечных клеток [17], можно предположить о сигнальной роли субстратов цикла Кребса — кетоглутарата и сукцината. Кетоглутарат и сукцинат, помимо метаболического пути воздействия, могут выступать лигандами специфических рецепторов GPR99 и SUCNR1, соответственно [12, 15, 22].

В проведённом исследовании наблюдается усиление статической выносливости ко 2-й неделе в группе ДМАЭ-малат и ДМАЭ-кетоглутарат, к 4-й неделе — в группах ДМАЭ-кетоглутарат и ДМАЭ-сукцинат.

Окисление сукцината обеспечивает накопление кальция и опосредованные данным

Таблица 7. Квадратичная матрица апостериорных сравнений исследуемых соединений через 4 недели с использованием критерия Ньюмана—Кеулса

Table 7. Quadratic matrix of a posteriori comparisons of the studied compounds after 4 weeks using the Newman—Keuls test

Препарат	Этилтиобензимидазол	ДМАЭ-малат	ДМАЭ-кетоглутарат	ДМАЭ-сукцинат	ДМАЭ-фумарат
Этилтиобензимидазол	—	0,744	0,001*	0,096	0,562
ДМАЭ-малат	0,744	—	0,001*	0,117	0,487
ДМАЭ-кетоглутарат	0,001	0,001*	—	0,033	0,001*
ДМАЭ-сукцинат	0,096	0,117	0,033	—	0,042*
ДМАЭ-фумарат	0,562	0,487	0,001*	0,042*	—

Примечание: * — различия для препарата в строке статистически значимы по сравнению с препаратом, представленном в соответствующем столбце ($p < 0,05$).

Note: * — the differences for the drug in the row are statistically significant in comparison with the drug presented in the corresponding column ($p < 0.05$).

Таблица 8. Прирост массы тела (g) исследуемых групп на 4-й неделе исследования
Table 8. Increase in the body weight of mice (g) of the studied groups at the 4th week of the study

Этап исследования	Группа	Значения переменной			p-уровень межгрупповых различий ¹	p-уровень парных межгрупповых различий ²
		N	Mean	SD		
4 неделя	Контрольная	12	11,88	2,32	0,027*	—
	Этилпиобензимидазол	12	13,13	1,52		0,750
	ДМАЭ-малат	12	13,21	3,19		0,702
	ДМАЭ-кетоглутарат	12	15,38	2,93		0,022**
	ДМАЭ-сукцинат	12	14,88	3,68		0,062
	ДМАЭ-фумарат	12	12,21	3,51		0,999

Примечание:¹ — значение p-уровня значимости в One Way ANOVA; ² — значение p-уровня значимости при сравнении с использованием критерия Дуннета (апостериорное сравнение с контрольной группой); * — различия, полученные с использованием One Way ANOVA, статистически значимы ($p < 0,05$); ** — различия, полученные с использованием критерия Дуннета, статистически значимы ($p < 0,05$).

Note:¹ — p-value of the significance in One Way ANOVA; ² — p-value of significance in the Dunnett test (a posteriori comparison with the control group); * — differences obtained using One Way ANOVA are statistically significant ($p < 0.05$); ** — differences obtained using the Dunnett test are statistically significant ($p < 0.05$).

катионом интенсивные функции, такие как мышечное сокращение. Ограничение окисления сукцината α -кетоглутаратом предупреждает чрезмерное поступление кальция, перегрузку кальций-выводящих каналов и инициацию избыточного образования свободных радикалов в митохондриях. Этим достигается стабильность энергообразовательной функции митохондрий, восполнение фонда АТФ и ГТФ в тканях, поддержание работы органов в условиях различных физиологических и патологических состояний [14]. Видимо поэтому наблюдался такой ровный рост статической выносливости во время всего эксперимента в случае применения ДМАЭ-кетоглутарата, что также подтверждают нижеприведённые данные по росту мышечной массы.

Интересно, что фумаратная соль производного ДМАЭ при курсовом введении оказывает противоположное действие. Согласно литературным данным, фумаратсодержащие препараты могут быть использованы для коррекции нарушений энергетического обмена и устранения энергодифицита при гипоксии [4, 13, 21]. Эти соединения оказывают наибольший эффект в условиях жёсткой гипоксии (фактически, аноксии). Механизм их действия в данном случае обусловлен инверсией

терминальных реакций цикла Кребса, т.е. запуском реакций превращения «сукцинат—фумарат—малат» в обратном направлении. В результате происходит накопление сукцината, который впоследствии (при уменьшении глубины гипоксии и восстановлении прямого направления реакций) окисляется с дополнительным получением энергии. Однако в ходе проведенного эксперимента моделировались нагрузки умеренной интенсивности (аэробный, аэробно-анаэробный режим), поэтому, очевидно, значимого положительного влияния ДМАЭ-фумарат на показатели работоспособности не оказал.

Достоверные различия между исследуемыми группами по приросту массы тела с использованием дисперсионного анализа ($p = 0,027$) были выявлены только через 4 недели тренировок у групп, получавших ДМАЭ-сукцинат (недостоверно) и ДМАЭ-кетоглутарат (достоверно) (табл. 8).

Апостериорное сравнение с применением критерия Дуннета показало, что после введения ДМАЭ-кетоглутарата исследуемый показатель на 4-й неделе был достоверно выше, чем в контрольной группе, на 29% ($p = 0,022$). Введение остальных соединений также способствовало приросту массы тела,

Таблица 9. Статистически значимое влияние на показатели статической и динамической выносливости, а также на мышечную массу производных диметиламиноэтанола с интермедиатами цикла трикарбоновых кислот

Table 9. Statistically significant effect of dimethylaminoethanol derivatives with tricarboxylic acid cycle intermediates on the indicators of static and dynamic endurance and body weight

Группа	ДМАЭ-малат		ДМАЭ-кетоглутарат		ДМАЭ-сукцинат	
	2 неделя	4 неделя	2 неделя	4 неделя	2 неделя	4 неделя
Динамическая выносливость		+		±		±
Статическая выносливость	+		+	+		+
Масса тела				+		±

однако уровень различий с группой контроля был статистически не значим.

Р-уровни апостериорных сравнений с использованием критерия Ньюмана—Кеулса после введения исследуемых соединений были выше уровня значимости (0,05), что свидетельствовало об отсутствии существенных различий между группами по приросту массы тела.

Через 4 недели тренировок наилучшие результаты (в порядке возрастания) по сравнению с исходным уровнем показали животные, получавшие ДМАЭ-малат, ДМАЭ-сукцинат и ДМАЭ-кетоглутарат. При этом их показатели статической и динамической выносливости и координации оказались достоверно выше, чем в контроле, и сопоставимы с таковыми у этилтиобензидазола. Полученные данные коррелируют с результатами других авторов [10].

Таким образом, среди изученных соединений наиболее перспективными с точки зрения повышения физической работоспособности являются ДМАЭ-малат, ДМАЭ-кетоглутарат и ДМАЭ-сукцинат (табл. 9).

Выводы

На основании проведённой работы можно сделать следующие выводы:

1. Тренировочный процесс вносит вклад в увеличение как статической, так и дина-

мической работоспособности, а также прирост мышечной массы экспериментальных животных, что подтверждает эффективность выбранного режима тренировок.

2. Наибольшее влияние на динамическую выносливость и координацию движений оказал ДМАЭ-малат спустя 4 недели тренировок, превзойдя показатели контрольной группы на 60% ($p=0,011$). Показатели динамической выносливости во всех исследуемых группах ДМАЭ-интермедиат ЦТК статистически значимо не отличались от препарата сравнения — этилтиобензидазола.

3. Сила хвата достоверно увеличивалась начиная со второй недели тренировок в группах животных, получавших ДМАЭ-малат (на 16%, $p=0,005$) и ДМАЭ-кетоглутарат (на 15,8%, $p=0,006$), однако к 4-й неделе наилучшие показатели продемонстрировали ДМАЭ-кетоглутарат (на 19,7%, $p=0,0001$) и ДМАЭ-сукцинат (на 12,2%, $p=0,003$) по сравнению с контрольной группой и группой этилтиобензидазола.

4. Введение всех исследуемых препаратов ДМАЭ-интермедиат ЦТК способствовало приросту массы тела, при этом к 4-й неделе эксперимента данный показатель был достоверно выше у группы животных, получавших ДМАЭ-кетоглутарат (на 29%, $p=0,022$).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Каркищенко В.Н., Фокин Ю.В., Казакова Л.Х., Алимкина О.В., Касинская Н.В. Методики изучения физиологических функций лабораторных животных для доклинических исследований в спортивной медицине. *Биомедицина*. 2012;4:15–21. [Karkischenko V.N., Fokin Yu.V., Kazakova L.Kh., Alimkina O.V., Kasinskaya N.V. Metodiki izucheniya fiziologicheskikh funktsij laboratornykh zhivotnykh dlja doklinicheskikh issledovanij v sportivnoj medicinine [Methods for studying the physiological functions of laboratory animals for preclinical research in sports medicine]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2012;4:15–21. (In Russian)].
2. Каркищенко Н.Н., Уйба В.В. *Очерки спортивной фармакологии. Т. 4. Векторы энергообеспечения*. М., СПб.: Айсинг, 2014:296. [Karkischenko N.N., Ujba V.V. *Ocherki sportivnoj farmakologii. T. 4. Vektory jenergoobespechenija [Essays on sports pharmacology. Vol. 4. Vectors of energy supply]*. Moscow, Saint Petersburg: Ajsing Publ., 2014:296. (In Russian)].
3. Клочков А.В., Баранов Л.Г. *Развитие выносливости: метод. реком.* Могилев: МГУ имени А.А. Кулешова, 2017:30. [Klochkov A.V., Baranov L.G. *Razvitie vynoslivosti [Development of endurance]: Guidelines*. Mogilev: MGU imeni A.A. Kuleshova Publ., 2017:30. (In Russian)].
4. Маевский Е.И., Гришина Е.В. Биохимические основы механизма действия фумарат-содержащих препаратов. *Биомедицинский журнал Medline.ru*. 2017;18:50–80. [Maevskij E.I., Grishina E.V. Biohimicheskie osnovy mehanizma dejstvija fumarat-soderzhazhshih preparatov [Biochemical basis of the mechanism of action of fumarate-containing preparations]. *Biomedical Journal Medline.ru*. 2017;18:50–80. (In Russian)].
5. *Методические рекомендации ФМБА России. Биомедицинское (доклиническое) изучение лекарственных средств, влияющих на физическую работоспособность*. М.: 2017:134. [Metodicheskie rekomendacii FMBA Rossii. *Biomedicinskoe (doklinicheskoe) izuchenie lekarstvennykh sredstv, vliyajushhij na fizicheskiju rabotosposobnost' [Methodical recommendations of FMBA of Russia. Biomedical (preclinical) study of drugs that affect physical performance]*. Moscow, 2017:134. (In Russian)].
6. Оковитый С.В., Радько С.В. Влияние различных фармакологических веществ на восстановление физической работоспособности после нагрузок в эксперименте. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2018;81(4):28–32. [Okovityj S.V., Rad'ko S.V. Vlijanie razlichnykh farmakologicheskikh veshhestv na vosstanovlenie fizicheskoi rabotosposobnosti posle nagruzok v jeksperimente [The influence of various pharmacological substances on the restoration of physical performance after exercise in the experiment]. *Experimental and Clinical Pharmacology*. 2018;81(4):28–32. (In Russian)].
7. Оковитый С.В., Радько С.В. Применение сукцинатов в спорте. *Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры*. 2015;92(6):59–65. [Okovityj S.V., Rad'ko S.V. Primenenie sukcinatov v sporte [The use of succinates in sports]. *Voprosy kurortologii, fizioterapii i lechebnoj fizicheskoj kul'tury [Questions of balneology, physiotherapy and physical therapy]*. 2015;92(6):59–65. (In Russian)].
8. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Под ред. А.Н. Миронова*. М.: Изд-во Гриф и К., 2012:944. [Rukovodstvo po provedeniju doklinicheskikh issledovanij lekarstvennykh sredstv. *Chast' pervaja [Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. Part one]*. Ed. by A.N. Mironov. Moscow: Izd-vo Grif i K. 2012:944. (In Russian)].
9. Сысоев Ю.И., Титович И.А., Оковитый С.В. Производные этаноламина как нейропротекторные средства. *Фармация*. 2019;68(1):48–55. [Sysoev Ju.I., Titovich I.A., Okovityj S.V. Proizvodnyje jetanolamina kak nejroprotektornye sredstva [Ethanolamine derivatives as neuroprotective agents]. *Pharmacy*. 2019;1:48–55. (In Russian)].
10. Шустов Е.Б., Болотова В.Ц. Биологическое моделирование утомления при физических нагрузках. *Биомедицина*. 2013;3:95–104. [Shustov E.B., Bolotova V.C. Biologicheskoe modelirovanie utomlenija pri fizicheskijh nagruzkah [Biological modeling of exercise fatigue]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2013;3:95–104. (In Russian)].
11. Шустов Е.Б., Каркищенко В.Н., Семёнов Х.Х. Поиск закономерностей, определяющих антигипоксическую активность соединений с ноотропным и нейропротекторным действием. *Биомедицина*. 2015;1:18–23. [Shustov E.B., Karkischenko V.N., Semenov H.H. Poisk zakonomernostej, opredelajushhijh antigipoksicheskiju aktivnost' soedinenij s nootropnym i nejroprotektornym dejstviem [Search for patterns that determine the antihypoxic activity of compounds with nootropic and neuroprotective effects]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2015;1:18–23. (In Russian)].
12. Aguiar C.J. Rocha-Franco J.A., Sousa P.A., et al. Succinate causes pathological cardiomyocyte hypertrophy through GPR91 activation. *Cell Communication and Signaling*. 2014;78(12):1–17.
13. Breuer J., Herich J., Schneider-Hohendorf T., et al. Dual action by fumaric acid esters synergistically reduces adhesion to human endothelium. *Mult. Scler. J*. 2017;24:1871–1882.
14. Cai X., Zhu C., Xu Y., Jing Y., Yuan Y., Wang L., et al. Alpha-ketoglutarate promotes skeletal muscle hypertrophy and protein synthesis through Akt/mTOR signaling pathways. *Scientific Reports*. *Springer Nature*. 2016;6(1):1–11.

15. He W., Miao F., Lin D., et al. Citric acid cycle intermediates as ligands for orphan G-protein-coupled receptors. *Nature*. 2004;429:188.
16. Malanga G. New insights on dimethylaminoethanol (DMAE) features as a free radical scavenger. *Drug Metabolism Letters*. 2012;6(1):54–59.
17. Marques-Aleixo I., Oliveira P.J., Moreira P.I., et al. Physical exercise as a possible strategy for brain protection: evidence from mitochondrial-mediated mechanisms. *Prog. Neurobiol.* 2012;99(2):149–162.
18. Oh S., Oliynyk S., Actoprotectors. *New class of pharmacological agents*. Seoul: Aprerio Publ., 2015:150.
19. Qiang F. Effect of Malate-oligosaccharide Solution on Antioxidant Capacity of Endurance Athletes. *The Open Biomedical Engineering J.* 2015;9:326–329.
20. Shipkowski K.A., Sanders J.M., McDonald J.D., et al. Comparative disposition of dimethylaminoethanol and choline in rats and mice following oral or intravenous administration. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2019:51.
21. Tang H., Lu J.Y., Zheng X., et al. The psoriasis drug monomethylfumurate is a potent nicotinic acid receptor agonist. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008;375:562–565.
22. Yuan Y., Yaqiong X., Jingren X., et al. Succinate promotes skeletal muscle protein synthesis via Erk1/2 signaling pathway. *Molecular Medicine Reports*. 2017;16(15). DOI: 10.3892/mmr.2017.7554.
23. Wu J.L., Wu Q.P., Huang J.M., et al. Effects of L-malate on physical stamina and activities of enzymes related to the malate-aspartate shuttle in liver of mice. *Physiol. Res.* 2007;56(2):213–220.
24. Zdzisińska B., Żurek A., Kandefer-Szerszeń M. Alpha-Ketoglutarate as a Molecule with Pleiotropic Activity: Well-Known and Novel Possibilities of Therapeutic Use. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. 2016;65(1):21–36.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Чистякова Елизавета Юрьевна*, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России;
e-mail: elizaveta.chistyakova@pharminnotech.com

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

Юсковец Валерий Николаевич, к.х.н., ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России;
e-mail: oxazin@yahoo.com

Лисицкий Дмитрий Сергеевич, к.б.н., ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России;
e-mail: dmitrii.lisitskii@pharminnotech.com

Верведа Алексей Борисович, к.м.н., ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова ФМБА России»;
e-mail: aleksivan02@rambler.ru

Elizaveta Yu. Chistyakova*, Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health care of Russia;
e-mail: elizaveta.chistyakova@pharminnotech.com

Sergey V. Okovityy, Dr. Sci. (Med.), Prof., Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health care of Russia;
e-mail: okovityy@mail.ru

Valerii N. Yuskovec, Cand. Sci. (Chem.), Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health care of Russia;
e-mail: oxazin@yahoo.com

Dmitrii S. Lisitskii, Cand. Sci. (Biol.), Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health care of Russia;
e-mail: dmitrii.lisitskii@pharminnotech.com

Alexey B. Verveda, Cand. Sci. (Med.), Scientific and Clinical Center of Toxicology named after Academician S.N. Golikov of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: aleksivan02@rambler.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author



ИЗУЧЕНИЕ АНТИГИПОКСИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ГАРМИНА ГИДРОХЛОРИДА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

С.М. Адекенов¹, В.Н. Каркищенко², М.С. Нестеров², Д.А. Абаимов^{3,*}, А.К. Сариев⁴

¹ АО «Международный научно-производственный холдинг «Фитохимия»
100009, Республика Казахстан, Караганда, ул. М. Газалиева, 4

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

³ ФГБНУ «Научный центр неврологии»
125367, Российская Федерация, Москва, Волоколамское ш., 80

⁴ ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова
Минздрава России (Сеченовский Университет)
119991, Российская Федерация, Москва, Трубецкая ул., 8, стр. 2

Производное бета-карболинового алкалоида гармина — препарат гармина гидрохлорид исследован на наличие антигипоксических свойств на моделях гипобарической гипоксии и нормобарической гипоксии с гиперкапнией. Было обнаружено, что гармина гидрохлорид не оказывает значимого компенсаторного эффекта в тесте нормобарической гипоксии с гиперкапнией. В то же время, гармина гидрохлорид в малых дозах (2,5 и 5 мг/кг) обладает противогипоксической активностью в тесте гипобарической гипоксии, что выражается в статистически достоверном увеличении продолжительности жизни животных, получавших препарат, по сравнению с контролем в условиях гипоксии. По противогипоксическому эффекту гармин гидрохлорид в дозах 2,5 и 5 мг/кг оказался сопоставим с препаратом сравнения (мексидол, 100 мг/кг).

Ключевые слова: гипоксия, гиперкапния, бета-карболиновые алкалоиды, гармина гидрохлорид

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Адекенов С.М., Каркищенко В.Н., Нестеров М.С., Абаимов Д.А., Сариев А.К. Изучение антигипоксических свойств гармина гидрохлорида в эксперименте. *Биомедицина*. 2021;17(2):71–78. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-2-71-78>

Поступила 01.02.2021

Принята после доработки 17.05.2021

Опубликована 10.06.2021

AN EXPERIMENTAL STUDY OF THE ANTIHYPOXIC PROPERTIES OF HARMINE HYDROCHLORIDE

Sergazy M. Adekenov¹, Vladislav N. Karkischenko², Maxim S. Nesterov²,
Denis A. Abaimov^{3,*}, Abrek K. Sariev⁴

¹ International Research and Production Holding «Phytochemistry»
100009, Republic of Kazakhstan, Karaganda, M. Gazalieva Str., 4

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

³ Scientific Center of Neurology
125367, Moscow, Volokolamskoe Highway, 80

⁴ First Moscow State Medical University named after I.M. Sechenov
of the Ministry of Health care of Russia (Sechenov University)
119991, Russian Federation, Moscow, Trubetskaya Str., 8, building 2

A derivative of the beta-carboline alkaloid harmine — the drug harmine hydrochloride was studied for the presence of antihypoxic properties in models of hypobaric hypoxia and normobaric hypoxia with hypercapnia. It was found that harmine hydrochloride does not have a significant compensatory effect in the normobaric hypoxia test with hypercapnia. At the same time, harmine hydrochloride in small doses (2.5 and 5 mg/kg) has antihypoxic activity in the hypobaric hypoxia test, which is expressed in a statistically significant increase in the life expectancy of animals treated with the drug, compared with the control, in conditions of hypoxia. According to the antihypoxic effect, harmine hydrochloride at doses of 2.5 and 5 mg/kg was found to be comparable with the reference drug (mexidol, 100 mg/kg).

Key words: hypoxia, hypercapnia, beta-carboline alkaloids, harmine hydrochloride

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

For citation: Adekenov S.M., Karkischenko V.N., Nesterov M.S., Abaimov D.A., Sariev A.K. The experimental study of the antihypoxic properties of harmine hydrochloride. *Journal Biomed.* 2021;17(2):71–78. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-2-71-78>

Submitted 01.02.2021

Revised 17.05.2021

Published 10.06.2021

Введение

Термин «гипоксия» означает абсолютную или относительную недостаточность энергообеспечения органов и тканей организма для их оптимального функционирования и интенсивности пластических процессов в них [2]. Дополнительное отрицательное влияние на организм может оказывать также гиперкапния, нередко развивающаяся при гипоксии в результате компенсаторной гипервентиляции легких и приводящая к ухудшению кровоснабжения головного мозга, сердца, нарушениям электролитного баланса и алкалозу. В нормальных условиях эффективность биологического окисления, являющегося основным

источником богатых энергией фосфорных соединений, необходимых для функции и обновления структур, соответствует функциональной активности органов. При нарушении этого соответствия возникает состояние энергетического дефицита, приводящее к разнообразным функциональным и морфологическим нарушениям, вплоть до гибели ткани. Гипоксия приводит к комплексной модификации функций биологических мембран, затрагивающей как липидный бислой, так и мембранные ферменты. Повреждаются или модифицируются главные функции мембран: барьерная, рецепторная, каталитическая. Основными причинами этого явления слу-

жат энергодефицит и активация на его фоне фосфолиполиза и перекисного окисления липидов. Распад фосфолипидов и ингибирование их синтеза ведут к повышению концентрации ненасыщенных жирных кислот (ЖК), усилению их перекисного окисления. Последнее стимулируется в результате подавления активности антиоксидантных систем из-за распада и торможения синтеза их белковых компонентов и, в первую очередь, супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы и др. [4]. Гипоксия наблюдается весьма часто и служит патогенетической основой разнообразных патологических процессов. С целью компенсации подобного состояния фармакологической наукой был разработан целый ряд лекарственных соединений, объединенных в группу под названием антигипоксанты. Антигипоксанты — группа лекарственных средств, улучшающих утилизацию циркулирующего в организме кислорода и повышающих устойчивость к гипоксии (кислородной недостаточности). В зависимости от механизма действия антигипоксанты подразделяются на макроэргические соединения, сукцинатсодержащие и сукцинатобразующие средства, естественные компоненты дыхательной цепи, искусственные редокс-системы и ингибиторы окисления жирных кислот [3]. К числу последних принадлежат препараты, обладающие свойствами антиоксидантов. Именно среди доказанных антиоксидантов ведется направленный поиск веществ с антигипоксическими свойствами. В частности, на антигипоксическую активность исследуются многочисленные антиоксиданты растительного происхождения. Направленный поиск веществ-кандидатов ведется, например, среди бета-карболиновых алкалоидов [7]. Бета-карболиновые алкалоиды образуются в результате конденсации между индоламином и короткоцепочечной карбоновой кислотой или альдегидом (например, ацетальдеги-

дом). Индолы и производные триптофана проявляют антиоксидантное действие, удаляя свободные радикалы и образуя резонансно-стабилизированные индолильные радикалы. Бета-карболиновые алкалоиды в большом количестве содержатся в стеблях, соцветиях и семенах могильника обыкновенного, или гармалы (*Peganum harmala L.*). В исследовании [8] было показано, что алкалоиды гармалы, такие, как бета-карболиновый алкалоид гарман и родственные ему соединения (гармалин, гармин), демонстрируют зависимое от концентрации ингибирование перекисного окисления липидов в экспериментах на микросомах печени. В более поздней работе [6] проведено исследование защитного эффекта экстракта *Peganum harmala L.* и двух основных алкалоидов данного растения (гармина и гармалина) против CuSO_4 -индуцированного окисления липопротеидов низкой плотности. Посредством определения образования малонового диальдегида (MDA) и сопряженного диена, а также лаг-фазы обнаружено, что экстракт гармалы обладает выраженным ингибирующим эффектом на процессы окисления липидов. Кроме того, гармалин и гармин снижали скорость утилизации витамина Е и проявляли значительную способность к поглощению свободных радикалов. Указанные свойства позволяют рассматривать бета-карболиновые алкалоиды могильника обыкновенного (рис. 1), в частности алкалоид гармин (1), в качестве потенциальных антигипоксантов. Однако гармин по своим физико-химическим свойствам относится к высоколипофильным соединениям, что вносит существенные ограничения при разработке удобных лекарственных форм данного соединения, в частности, ограничивает возможность создания инъекционных форм препарата. В этой связи, в Международном научно-производственном холдинге «Фитохимия» (Республика Казахстан, г. Караганда) син-

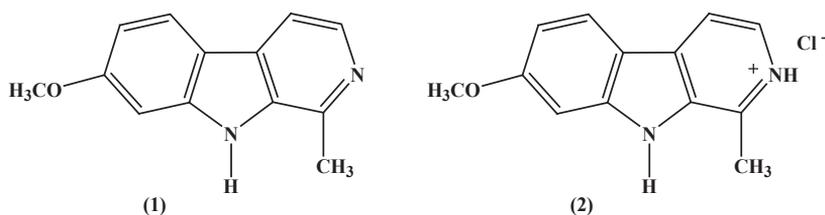


Рис. 1. Структурная формула алкалоида гармина (1) и гармина гидрохлорида (2).
Fig. 1. The structural formula of the harmine alkaloids (1) and harmine hydrochloride (2).

тезировано его более гидрофильное производное — гармина гидрохлорид (2), который обладает способностью растворяться в воде и этиловом спирте [1].

В связи с этим **целью** представленного исследования стало изучение противогипоксического действия гармина гидрохлорида в основных тестах оценки противогипоксического эффекта (гипобарической гипоксии и нормобарической гипоксии с гиперкапнией в гермообъеме) на нелинейных мышах-самцах.

Материалы и методы

В исследовании использованы сертифицированные методики, рекомендуемые для исследования веществ, обладающих противогипоксическим действием, изложенные в «Руководстве по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» [5].

Животные

Исследования были выполнены в опытах на нелинейных половозрелых белых мышах-самцах массой $27,5 \pm 0,8$ г. Экспериментальные животные получены из Филиала «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России (Московская обл.). Экспериментальные животные содержались на постоянном доступе к корму и воде — использовался полный рацион экструдированного брикетированного корма (ГОСТ на корм Р 50258–92) и питьевая вода. Животные содержались в виварии при температурном режиме 20–22°C,

при световом режиме 12/12, в полипропиленовых клетках с решеткой из цинкохромовой стали, с подстилкой обеспыленной из деревянной стружки, по 10 мышей в каждой клетке (Т/3 С). Содержание животных осуществлялось в соответствии с «Санитарными правилами по устройству, оборудованию и содержанию вивариев», утвержденными главным государственным санитарным врачом 06.04.1973 г. № 1045–73.

Препараты

Гармина гидрохлорид и препараты сравнения вводили однократно внутривентриально за 40 мин до тестирования. Гармина гидрохлорид вводили в малых дозах — 2,5 мг/кг и 5 мг/кг. Выбор указанных доз основан на данных, полученных ранее в рамках проведения психофармакологического скрининга гармина гидрохлорида в диапазоне дозировок от 0,001 до 0,1 ЛД₅₀. В качестве препарата сравнения использовали антигипоксиксанта мексидол.

Изучение противогипоксического действия гармина гидрохлорида в сравнении с мексидолом

Изучение противогипоксического действия гармина гидрохлорида в дозах 2,5 мг/кг и 5 мг/кг проводили в опытах на половозрелых нелинейных белых мышах-самцах. Использовали 2 базисных теста оценки противогипоксического эффекта: гипобарическая гипоксия и нормобарическая гипоксия с гиперкапнией

в гермообъеме, согласно Методическим указаниям по изучению активности веществ, обладающих ноотропной активностью, изложенным в «Руководстве по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» [5]. В качестве препарата сравнения использован мексидол в дозах 100 и 200 мг/кг. Гармина гидрохлорид и препарат сравнения мексидол вводили однократно внутривенно за 40 мин до эксперимента. Животным контрольной группы вводили дистиллированную воду в эквивалентном объеме 1 мл на 100 г массы тела мышей).

Изучение противогипоксического действия гармина гидрохлорида по методике гипобарической гипоксии в сравнении с мексидолом

Методом рандомизации животные были поделены на 5 групп:

- 1) контроль — 40 мышей (контроль ставится для каждой дозы вещества, в камеру помещаются одновременно опытное и контрольное животное);
- 2) гармина гидрохлорид в дозе 2,5 мг/кг — 10 мышей;
- 3) гармина гидрохлорид в дозе 5 мг/кг — 10 мышей;
- 4) мексидол в дозе 100 мг/кг — 10 мышей;
- 5) мексидол в дозе 200 мг/кг — 10 мышей.

Острую гипобарическую гипоксию моделировали в проточно-вытяжной барокамере. Давление регистрировали высотомером, скорость подъема — вариометром. Животных «поднимали» со скоростью 20 м/с до площадки «высотой» 11 000 м. Экспозиция составляла 10 мин. Оценивали продолжительность жизни животных. Для создания идентичных условий гипоксии в камеру одновременно помещали животных опытной и контрольной групп. Каждая доза вещества изучалась на 10 животных.

Изучение противогипоксического действия гармина гидрохлорида по методике нормобарической гипоксии с гиперкапнией в гермообъеме (баночная гипоксия) в сравнении с мексидолом

Исследование проводили на белых нелинейных мышах-самцах, поделенных на пять аналогичных групп. Модель гипоксии с гиперкапнией в гермообъеме проводили согласно стандартному протоколу [5]. Мышей помещали в герметично закупоренную стеклянную емкость объемом 190 мл. Оценивали продолжительность жизни животных по отношению к контролю.

Результаты и их обсуждение

Результаты, полученные при изучении влияния гармина гидрохлорида в условиях гипобарической гипоксии, выявили наличие противогипоксических свойств у соединения. Так, гармина гидрохлорид в дозе 2,5 мг/кг и в дозе 5 мг/кг увеличил продолжительность жизни животных в 2,48 и в 2,4 раза соответственно, относительно контроля (табл. 2). Под действием гармина гидрохлорида увеличилось также количество животных, латентное время (ЛВ) гибели которых в два и более раза превышало латентное время гибели в соответствующем контроле (равном в среднем 100 с) (табл. 1).

Выявленный противогипоксический эффект гармина гидрохлорида в малых дозах сравним с эффектом мексидола в дозе 100 мг/кг и превосходит активность мексидола при его использовании в дозе 200 мг/кг.

Таким образом, гармина гидрохлорид в дозах 2,5 мг/кг и 5 мг/кг обладает противогипоксической активностью в тесте гипобарической гипоксии, сравнимой с активностью мексидола в дозе 100 мг/кг. В то же время по результатам эксперимента в условиях нормобарической гипоксии гармина гидрохлорид не проявил способность противодействовать данному

Таблица 1. Противогипоксические свойства гармина гидрохлорида в сравнении с мексидолом в условиях модели гипобарической гипоксии на мышах (Mean±SEM)

Table 1. Antihypoxic properties of harmine hydrochloride in comparison with mexidol in a mouse model of hypobaric hypoxia (Mean±SEM)

Группа, масса животных	Время выживания (резервное время) за 10 мин экспозиции на высоте 11 000 м, мин:с	Число животных в группе с ЛВ гибели более 3 мин, %
Контроль, m=25,5 г	1,52±0,09	10
Мексидол, 100 мг/кг в/б, m=26,5 г	4,40±0,73*	60 [^]
Контроль, m=25,8 г	1,35±0,11	0
Мексидол, 200 мг/кг в/б, m=27,5 г	2,14±0,1*	10
Контроль, m=27,4 г	1,34±0,12	0
Гармина гидрохлорид, 2,5 мг/кг в/б, m=27,9 г	3,32±0,35*#	70 [^]
Контроль, m=27,0 г	1,46±0,16	0
Гармина гидрохлорид, 5 мг/кг в/б, m=26,2 г	3,50±0,35*#	80 [^]

Примечание: * — $p < 0,05$ достоверность различий по критерию Манна—Уитни в сравнении с группой контроля; # — $p < 0,05$ достоверность различий по критерию Манна—Уитни в сравнении с группой мексидол (200 мг/кг); [^] — $p < 0,05$ достоверность различий по критерию хи-квадрат в сравнении с контрольной группой.

Note: * — $p < 0.05$ significance of differences according to the Mann—Whitney test in comparison with the control group; # — $p < 0.05$ significance of differences according to the Mann—Whitney test in comparison with the mexidol group (200 mg/kg); [^] — $p < 0.05$ significance of differences according to the chi-square test in comparison with the control group.

Таблица 2. Противогипоксические свойства гармина гидрохлорида в сравнении с мексидолом при введении мышам в условиях модели нормобарической гипоксии с гиперкапнией (баночная гипоксия) (Mean±SEM)

Table 2. Antihypoxic properties of harmine hydrochloride in comparison with mexidol when administered to mice under conditions of a normobaric hypoxia model with hypercapnia (canned hypoxia) (Mean±SEM)

Группа, масса животных	Время выживания (резервное время), мин
Контроль, m=25,5 г	14,14±0,13
Мексидол, 100 мг/кг в/б, m=26,5 г	14,42±0,14
Контроль, m=25,8 г	14,22±0,12
Мексидол, 200 мг/кг в/б, m=27,5 г	15,21±0,34*
Контроль, m=27,4 г	14,17±0,13
Гармина гидрохлорид, 2,5 мг/кг в/б, m=27,9 г	14,34±0,16
Контроль, m=27,0 г	14,24±0,35
Гармина гидрохлорид, 5 мг/кг в/б, m=26,2 г	14,48±0,33

Примечание: * — $p < 0,05$ достоверность различий по критерию Манна—Уитни в сравнении с группой контроля.

Note: * — $p < 0.05$ significance of differences according to the Mann—Whitney test in comparison with the control group.

виду гипоксии. Согласно представленным в табл. 2 результатам, гармина гидрохлорид в изученных дозах не оказывал противогипоксического действия на модели нормобарической гипоксии с гиперкапнией, тогда как препарат сравнения (мексидол) был эффективен в условиях данной модели в дозе 200 мг/кг.

Таким образом, гармина гидрохлорид в дозах 2,5 мг/кг и 5 мг/кг не обладает противогипоксическим эффектом в тесте нормобарической гипоксии с гиперкапнией,

в противоположность мексидолу в дозе 200 мг/кг, который оказывает противогипоксический эффект в данном тесте.

Возможно, различия в антигипоксантажной активности гармина гидрохлорида в двух разных тестах связаны с тем, что данный препарат реализует свой эффект путем ингибирования перекисного окисления жирных кислот, что более актуально при гипоксии, не осложнённой гиперкапнией, а именно в условиях гипобарической гипоксии.

Выводы

1. Гармина гидрохлорид не оказывает значимого компенсаторного эффекта в тесте нормобарической гипоксии с гиперкапнией.

2. Гармина гидрохлорид в малых дозах (2,5 и 5 мг/кг) обладает противогипоксической активностью в тесте гипобарической

гипоксии, что выражается в статистически достоверном увеличении продолжительности жизни животных по сравнению с контролем в условиях гипоксии.

3. По противогипоксическому эффекту гармина гидрохлорид в дозах 2,5 и 5 мг/кг сопоставим с препаратом сравнения (мексидолом) в дозе 100 мг/кг.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Адекенов С.М., Нурмаганбетов Ж.С., Турмухамбетов А.Ж., Анаев А.А., Арыстан Л.И., Сариев А.К. *Применение 7-метокси-1-метил-9H-пиридо[3,4-b]индол-2N-гидрохлорида в качестве антидепрессивного, противогипоксического и антипаркинсонического средства*. Инновационный патент РК № 29584. 2015. Бюл. № 3. [Adekenov S.M., Nurmaganbetov Zh.S., Turmukhambetov A.Zh., Anayev A.A., Arystan L.I., Sariyev A.K. *Primeneniye 7-metoksi-1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol-2N-gidrokhlorida v kachestve antidepressivnogo, protivogipoksicheskogo i antiparkinsonicheskogo sredstva* [Application of 7-methoxy-1-methyl-9H-pyrido [3,4-b] indole-2N-hydrochloride as an antidepressant, antihypoxic and antiparkinsonian agent]. Innovative patent of the Republic of Kazakhstan No. 29584. 2015. Byul. No. 3. (In Russian)].
2. Елисеев А.Г., Гитун Т. *Большая медицинская энциклопедия*. М.: ДиректМедиа, 2005:1000. [Yeliseyev A.G., Gitun T. *Bol'shaya meditsinskaya entsiklopediya* [Great medical encyclopedia]. Moscow: DirektMedia Publ., 2005:1000. (In Russian)].
3. Оковитый С.В., Гайворонская В., Куликов А., Шуленин С. *Клиническая фармакология. Избранные лекции*. М.: ГЭОТАР-Медиа. 2009:608. [Okovityi S.V., Gayvoronskaya V., Kulikov A., Shulenin S. *Clinical pharmacology. Izbrannyye lektzii* [Selected lectures]. Moscow: GEOTAR-Media Publ., 2009:608. (In Russian)].
4. Оковитый С.В., Суханов Д.С., Заплутанов В.А., Смагина А.Н. Антигипоксанты в современной клинической практике. *Клиническая медицина*. 2012;90(9):63–68. [Okovityi S.V., Sukhanov D.S., Zaplutanov V.A., Smagina A.N. Antigipoksanty v sovremennoy klinicheskoy praktike [Antihypoxants in modern clinical practice]. *Clinical medicine*. 2012;90(9):63–68. (In Russian)].
5. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*. Под ред. Р. Хабриева и др. М.: Медицина, 2005:832. [Rukovodstvo po eksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniyu novykh farmakologicheskikh veshchestv [Guidelines for experimental (preclinical) study of new pharmacological substances]. Ed. by R. Khabriyev, et al. Moscow: Meditsina Publ. 2005:832. (In Russian)].
6. Berrougui H., Isabelle M., Cloutier M., Hmamouchi M., Khalil A. Protective effects of Peganum harmala L. extract, harmine and harmaline against human low-density lipoprotein oxidation. *J. Pharm. Pharmacol.* 2006;58(7):967–974.
7. Li S.P., Wang Y.W., Qi S.L., Zhang Y.P., Deng G., Ding W.Z., Ma C., Lin Q.Y., Guan H.D., Liu W., Cheng X.M., Wang C.H. Analogous beta-carboline alkaloids harmaline and harmine ameliorate scopolamine-induced cognition dysfunction by attenuating acetylcholinesterase activity, oxidative stress, and inflammation in mice. *Front. Pharmacol.* 2018;9:346.
8. Tse S.Y., Mak I.T., Dickens B.F. Antioxidative properties of harmine and beta-carboline alkaloids. *Biochem. Pharmacol.* 1991;42(3):459–464.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Адекенов Сергазы Мынжасарович, д.х.н., проф., акад. Национальной академии наук Республики Казахстан, АО «Международный научно-производственный холдинг «Фитохимия»; e-mail: info@phyto.kz

Sergazy M. Adekenov, Dr. Sci. (Chem.), Prof., Acad. of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan, International Research and Production Holding “Phytochemistry”; e-mail: info@phyto.kz

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

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

Абаимов Денис Александрович*, к.б.н., ФГБНУ «Научный центр неврологии»;
e-mail: abaidenis@yandex.ru

Сариев Абрек Куангалиевич, д.м.н., проф., ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет);
e-mail: danisarov@yandex.ru

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

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

Denis A. Abaimov*, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Center of Neurology;
e-mail: abaidenis@yandex.ru

Abrek K. Sariev, Dr. Sci. (Med.), Prof., First Moscow State Medical University named after I.M. Sechenov of the Ministry of Health care of Russia (Sechenov University);
e-mail: danisarov@yandex.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author



IN VITRO ИССЛЕДОВАНИЕ БИОСОВМЕСТИМОСТИ ТИТАНОВЫХ СПЛАВОВ С МОДИФИЦИРОВАННОЙ ПОВЕРХНОСТЬЮ

У.Э. Ешкулов^{1*}, В.А. Тарбоков², С.Ю. Иванов^{1,3}, Н.А. Ночовная⁴, А.Д. Дымников¹,
Р.С. Алымбаев⁵

¹ ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»
117198, Российская Федерация, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6

² ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет»
634050, Российская Федерация, Томск, пр. Ленина, 30

³ ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова»
Минздрава России (Сеченовский Университет)
119991, Российская Федерация, Москва, ул. Трубецкая, 8/2

⁴ ФГУП «Всероссийский научно-исследовательский институт авиационных материалов» ГНЦ РФ
105005, Российская Федерация, Москва, ул. Радио, 17

⁵ НПО «Профилактическая медицина»
720005, Кыргызская Республика, Бишкек, ул. Байтик-Батыра, 34

В работе приведены результаты сравнительного *in vitro* исследования биосовместимости титановых образцов, поверхность которых была подвергнута различным способам предварительной обработки: фрезерованию, механической обработке с кислотным травлением и облучением мощным ионным пучком (МИП) для создания рельефа с заданной величиной шероховатости и формой неровностей. Исследование эффективности прикрепления и роста фибробластов линии Balb/3T3 на изделиях из титана с различными типами обработки поверхности продемонстрировало, что после обработки мощным ионным пучком (МИП) титановой поверхности клетки активно её колонизировали, были распластаны и имели звездчатую форму, т.е. находились в состоянии активного роста. Оценка миграции примесей металла из титанового сплава ВТ 1-0 проводилась рентгенофлуоресцентным методом.

Ключевые слова: мощный ионный пучок, адгезия, фибробласты линии Balb/3T3, биосовместимость, рентгенофлуоресцентный анализ

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Ешкулов У.Э., Тарбоков В.А., Иванов С.Ю. Ночовная Н.А. Дымников А.Д., Алымбаев Р.С. *In vitro* исследование биосовместимости титановых сплавов с модифицированной поверхностью. *Биомедицина*. 2021;17(2):79–87. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-2-79-87>

Поступила 08.04.2020

Принята после доработки 06.02.2021

Опубликована 10.06.2021

IN VITRO RESEARCH INTO THE BIOCOMPATIBILITY OF TITANIUM ALLOYS WITH A MODIFIED SURFACE

Urmat E. Eshkulov^{1,*}, Vladislav A. Tarbokov², Sergey Yu. Ivanov^{1,3},
Nadezhda A. Nochovnaya⁴, Alexandr B. Dymnikov¹, Ruslan S. Alymbaev⁵

¹ The Peoples' Friendship University of Russia
117198, Russian Federation, Moscow, Miklukho-Maklaya Str., 6

² National Research Tomsk Polytechnic University
634050, Russian Federation, Tomsk, Lenina Avenue, 30

³ First Moscow State Medical University named after I.M. Sechenov
of the Ministry of Health care of Russia (Sechenov University)
119991, Russian Federation, Moscow, Trubetskaya Str., 8/2

⁴ All-Russian Scientific Research Institute of Aviation Materials
105005, Russian Federation, Moscow, Radio Str., 17

⁵ Scientific and Production Association "Preventive Medicine"
720005, Kyrgyz Republic, Bishkek, Baytik-Batyra Str., 34

This work presents the results of a comparative *in vitro* study into the biocompatibility of titanium samples, the surface of which was pre-treated using various methods: milling, machining with acid etching and irradiation with a powerful ion beam (PIB) for creating a relief with the required roughness and the shape of asperities. A study of the effectiveness of attachment and growth of Balb/NIH 3T3 fibroblasts on titanium products with various types of surface treatment demonstrated that irradiation of a titanium surface with a powerful ion beam (PIB) leads to its active colonization with cells having a flattened and stellate shape, which confirms their active growth. An assessment of migration of metal impurities from the titanium alloy VT 1-0 was evaluated using the x-ray fluorescence method.

Keywords: PIB, adhesion, Balb/NIH 3T3 line, biocompatibility, x-ray fluorescence method

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

For citation: Eshkulov U.E., Tarbokov V.A., Ivanov S.Yu. Nochovnaya N.A., Dymnikov A.B., Alymbaev R.S. *In vitro* Researches into the Biocompatibility of Titanium Alloys with a Modified Surface. *Journal Biomed.* 2021;17(2):79–87. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-2-79-87>

Submitted 08.04.2020

Revised 06.02.2021

Published 10.06.2021

Введение

Полимерные, керамические и металлические имплантаты широко используются в регенеративной медицине, особенно для восстановления дефектов костной ткани в челюстно-лицевой хирургии и ортопедии [14, 15]. Использование таких имплантатов позволяет успешно восстанавливать даже критические костные дефекты, как было показано нами ранее [3, 6, 9, 18]. Однако титан и его сплавы являются наиболее используемыми материалами в челюстно-лицевой хирургии, травматологии и ортопедии, а также

в других областях оперативной хирургии, т.к. это биосовместимый, биоинертный материал, обладающий умеренно бактериостатическим эффектом [7, 8, 13]. В атмосферном воздухе за счет абсорбции атомов кислорода на поверхности титана образуется оксидная пленка, которая обладает остеокондуктивными свойствами. Незначительная диффузия ионов титана в окружающие ткани не влияет на жизнеспособность остеобластов, остеоцитов и фибробластов [8].

Сегодня существуют несколько типов обработки поверхности изделий из раз-

личных титановых сплавов. Поверхность исследуемых титановых дисков из сплава ВТ 1–0 была модифицирована путём фрезерования, механической обработки с кислотным травлением и обработкой мощным ионным пучком (МИП) [10, 12, 16].

Цель работы — исследование биосовместимости образцов изделий из титана с поверхностью, модифицированной стандартными методами и методом обработки МИП, на модели анализа клеточного роста *in vitro*.

Материалы и методы

Подготовка образцов

Для проведения исследований были изготовлены титановые диски ВТ 1–0 диаметром 6 мм толщиной 0,5 мм [10]. Диски отмывались в специальных растворах в ультразвуковых ваннах до достижения чистой титановой поверхности. Далее их разделили на четыре группы по 10 дисков в каждой. В первой группе поверхность обрабатывали с помощью метода облучения МИП, описанного в нашей предыдущей работе [10]. Во второй группе диски без специальной обработки представляли собой отмытые после фрезеровки образцы с гладкой титановой поверхностью. В третьей группе поверхность подвергали двойному кислотному травлению. Данный тип обработки применяется большинством производителей дентальных имплантатов [15]. Четвертая группа — контрольная, культуральный пластик.

Модифицирование поверхности титановых дисков проводилось на сильноточном импульсном ускорителе «Темп-4 М» пучком ионов, состоящим из углерода (70%) и водорода (30%), с плотностью тока 100 А/см², плотность энергии 2 Дж/см² в импульсе, при длительности импульса на полувывоте 70 нс и ускоряющем напряжении 200 кВ для придания оптимальной шероховатой пористой поверхности [4].

Тестирование вымывания примесей из титановых сплавов

Определение миграции примесей через поверхность титановых имплантатов с различным образом обработанной поверхностью проводилось с применением рентгенофлуоресцентного метода [5]. Имплантат помещали в 0,9% (вес.) р-р хлористого натрия при температуре 37°C. Изучали вымывание из образцов имплантатов ионов титана, алюминия и железа. После определения их концентрации в растворе полученные значения сравнивали со стандартными значениями в изотоническом р-ре для образцов с известной площадью поверхности.

Исследование биосовместимости титановых имплантатов

Исследование жизнеспособности клеток при их культивировании на поверхности имплантируемых материалов в условиях *in vitro* — широко распространенный метод доклинической оценки биосовместимости материалов. Среди наиболее распространенных тестов: оценка морфологии клеток при помощи флуоресцентной и сканирующей электронной микроскопии, а также биохимические тесты МТТ, ХТТ и МТС [1, 2, 11, 17]. Кроме того, тесты *in vitro* легко выполняются, хорошо поддаются стандартизации и могут проводиться многократно. В настоящем исследовании проводили сравнительный анализ биосовместимости *in vitro* образцов имплантатов из титанового сплава ВТ 1–0, обработанного тремя различными способами (три группы) с использованием культуры клеток мышинных фибробластов линии Balb/3T3 (ПанЭко, РФ) [17].

Фибробласты линии Balb/3T3 культивировали в стандартных условиях и высевали в количестве 5×10^3 кл/см² на поверхность образцов имплантатов, помещенных на дно лунок 24-луночного пластикового планшета. Биосовместимость исследуемых

образцов оценивали по возможности поддерживать жизнеспособность и пролиферативную активность клеток в культуре путем прямой визуализации, используя метод флуоресцентной микроскопии и оценивая морфофункциональное состояние клеток (визуальный контроль морфологического состояния клеток). Культивирование фибробластов проводили по стандартной методике [17]. Через 24 и 48 ч после засева клетки снимали с помощью трипсина и определяли количество клеток путем прямого подсчета в камере Горяева, а также оценивали жизнеспособность клеток и их пролиферативную активность с использованием реагента Cell Titer 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS метод) через 48 ч [17]. В качестве контрольных использовали клетки, посеянные в пустые лунки планшета, не содержащие изделий.

Итоговое число живых фибробластов линии Balb/3T3 определяли по их функциональной активности в пролиферативном тесте MTS. Известно, что живые клетки восстанавливают входящее в состав реагента химическое соединение MTS [3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сульфофенил)-2Н-тетразолий, внутренняя соль] с образованием окрашенного продукта восстановления — формаза, который растворяется в среде для культивирования клеток и окрашивает её. Оптическую плотность раствора (среды), содержащего растворенный формазан, измеряли при длине волны 490 нм на планшетном спектрофотометре Zenyth 3100 Microplate Multimode Detector (“Anthos Labtec Instruments GmbH”, Австрия). Количество восстановленного формаза прямо пропорционально количеству живых клеток в культуре. По формуле (1) вычисляли относительную жизнеспособность клеток:

$$\frac{\text{Жизнеспособность}=\text{ОП (культура+образец)}}{\text{ОП (интактная культура)}\times 100\%} \quad (1)$$

где ОП (культура+образец) — значение оптической плотности, полученное в лунках

клеток культивируемых на поверхности титанового диска, ОП (интактная культура) — значение оптической плотности, полученное в контрольных лунках, содержащих интактные клетки.

Статистический анализ

Статистическая обработка была проведена с помощью программы «Prism 6». Был использован двухфакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA). Данные в таблицах представлены в виде среднего значения в выборке (n=6) и стандартной ошибки.

Результаты и их обсуждение

Результаты исследования биосовместимости различных образцов титановых имплантатов

Через 48 ч культивирования фибробластов линии Balb/3T3 на поверхности образцов дисков проводили визуальную оценку морфофункционального состояния клеток. Используя стандартный протокол окрашивания акридиновым оранжевым, при помощи флуоресцентной микроскопии была зарегистрирована флуоресценция живых клеток, культивируемых на образцах титановых имплантатов. При сканировании каждого образца выявлено, что клетки располагаются равномерно по всей поверхности исследуемых образцов, плотность заселения образцов имплантатов фибробластами сравнима с плотностью клеток, культивируемых в стандартных условиях на стандартном культуральном пластике. Морфология клеток не нарушена. Анализ флуоресцентных изображений клеток на поверхности различных образцов продемонстрировал, что жизнеспособность популяции фибробластов составляет не менее 80%, что соответствует жизнеспособности клеток, культивируемых в стандартных условиях на поверхности культурального пластика. Следует отметить, что прикрепленные клетки на всех исследуемых

образцах титановых имплантатов были хорошо распластаны и имели звездчатую форму, т.е. были в состоянии нормального функционирования (рис.).

Подсчет фибробластов на всех сроках наблюдения во всех 3-х исследуемых группах (на всех типах титановых дисков) и контрольной группе показан в табл. 1. Двухфакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA), факторы «тип диска» и «время», показал отсутствие статистически значимых различий между группами (FDFn; DFd=X; p>0,05).

Таким образом, титановые имплантаты при прямом контакте с фибробластами не оказывали негативного влияния на их адгезию и рост.

При анализе влияния различных способов обработки поверхности титановых имплантатов на жизнеспособность и пролиферацию фибробластов линии Balb/NIH 3 T3 были получены следующие результаты (табл. 2). Сравнительный анализ оптической плотности при исследовании уровня клеточного метаболизма культивируемых фибробластов при помощи

Таблица 1. Число фибробластов линии Balb/NIH 3 T3 через 24 и 48 ч культивирования на поверхности образцов титановых имплантатов

Table 1 Number of Balb/NIH 3T3 fibroblasts following 24 and 48 hours of culture on the surface of titanium implant samples

Группа	Число клеток на образце ×10 ⁵ , 24 ч	Число клеток на образце ×10 ⁵ , 48 ч
Чистый титан	2,1±0,2	4,6±0,4
Обработка МИП	2,2±0,2	4,7±0,4
Кислотное травление	2,2±0,2	5,1±0,4
Культуральный пластик (контроль)	2,2±0,2	4,8±0,4

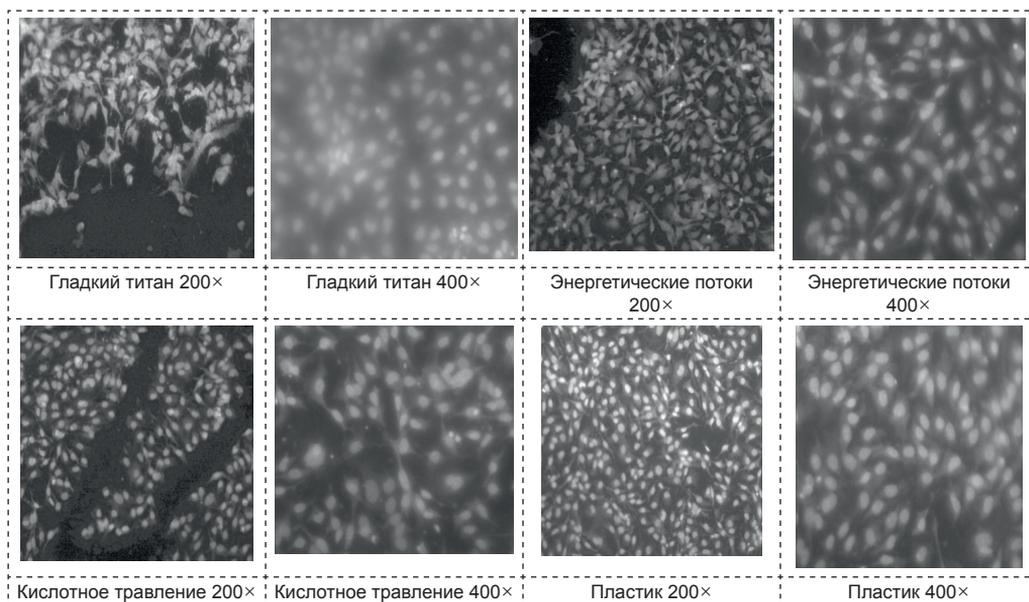


Рис. Морфология мышечных фибробластов линии Balb/NIH 3T3, выращенных на поверхности образцов титановых имплантатов, подвергнутых различным способам предварительной обработки.

Fig. Morphology of mouse fibroblasts of the Balb/NIH 3T3 line grown on the surface of titanium implant samples subjected to various pretreatment methods.

Таблица 2. Значение оптической плотности (MTS-тест) и показатель жизнеспособности фибробластов линии Balb/NIH 3T3 в процентном выражении, в зависимости от способа обработки поверхности образцов титановых имплантатов. Культивирование в течение 3-х сут

Table 2. Optical density values (MTS-test) and indicator of the viability index of Balb/NIH 3T3 fibroblasts in percent, depending on the method of surface treatment of titanium implant samples. Cultivated for 3 days

Исследуемые образцы	Чистый титан	Обработка МИП	Кислотное травление	Положительный контроль
Оптическая плотность	0,92	0,95	0,92	1,00
Жизнеспособность, %	91,9	95,2	92,5	100%

Примечание: n=3, показаны средние значения, статистическая обработка не проводилась.

Note: n=3, mean values shown, no statistical processing performed.

Таблица 3. Сравнительные характеристики миграции примесей металлов в 0,9% р-р NaCl из сплава VT 1-0 без обработки и с обработкой мощным ионным пучком

Table 3. Comparative characteristics of migration of metal impurities into 0.9% NaCl solution from a VT 1-0 alloy without treatment and with treatment with a powerful ion beam

Методика обработки	МИП	Механическая обработка	Контроль
Изменение значения pH вытяжки (ед.)	0,14	0,06	1
Миграция металлов в 0,9% р-р NaCl (мг/л):			
Ti	0,03 (TiO ₂)	0,08	0,1
Al	0,01	0,30	0,5
Fe	0,01	0,05	0,3
Гемолиз, %	0	0,39	2

MTS-теста в экспериментальных и контрольных лунках не выявил достоверных различий. Данный результат свидетельствует об отсутствии изменения пролиферативной активности клеток вне зависимости от способа обработки поверхности образцов титановых имплантатов. Оценка жизнеспособности выявила более 90% жизнеспособных клеток в экспериментальных лунках, что сравнимо с контрольным образцом.

Таким образом, исследуемые образцы титановых имплантатов продемонстрировали высокую биосовместимость в *in vitro* тестах с использованием фибробластов линии Balb/NIH 3 T3. Поверхность титановых дисков отвечает необходимым условиям культивирования клеток линии Balb/NIH-3T3, тем самым обеспечивая условия для их жизнеспособности и пролиферативной активности. Модификация структуры поверхности дисков не препятствует миграции клеток, не влияет на жизнеспособность и пролиферативную активность клеток.

Результаты миграции примесей металлов из сплава VT1-0

Проведенный сравнительный рентгенофлуоресцентный анализ миграции металлов показал, что поверхность титанового сплава после обработки МИП продемонстрировала результат эффективной очистки от примесей металлов (табл. 3).

Заключение

Обработка поверхности МИП не приводит к ухудшению биосовместимости *in vitro* образцов титановых имплантатов. В совокупности с показанными ранее преимуществами (очистка поверхности от легкоплавких примесей, удаление абразивных частиц после механической обработки и оплавление поверхности титановых образцов, что позволяет сформировать развитый микрорельеф с заданной шероховатостью и отсутствием острых кромок неровностей) метод обработки титановых сплавов МИП становится перспективным для использования в медицинской промышленности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Андреева Н.В., Бонарцев А.П., Жаркова И.И., Махина Т.К., Мышкина В.Л., Харитоновна Е.П., Воинова В.В., Бонарцева Г.А., Шайтан К.В., Белявский А.В. Культивирование мезенхимальных стволовых клеток мыши на матриксах из поли-3-оксибутирата. *Клеточные технологии в биологии и медицине*. 2015;2:114–119. [Andreeva N.V., Bonartsev A.P., Zharkova I.I., Makhina T.K., Myshkina V.L., Kharitonova E.P., Voinova V.V., Bonartseva G.A., Shaitan K.V., Belyavskii A.V. Kul'tivirovanie mezenhimal'nykh stvolovykh kletok myshi na matriksakh iz poli-3-oksibutirata [Culturing of mouse mesenchymal stem cells on poly-3-hydroxybutyrate scaffolds]. *Kletochnye tekhnologii v biologii i medicine [Cell technologies in biology and medicine]*. 2015;2:114–119. (In Russian)].
2. Бонарцев А.П., Бонарцева Г.А., Мышкина В.Л., Воинова В.В., Махина Т.К., Жаркова И.И., Яковлев С.Г., Зернов А.Л., Иванова Э.В., Акулина Е.А., Кузнецова Е.С., Жуйков В.А., Алексеева С.Г., Подгорский В.В., Бессонов И.В., Копицына М.Н., Морозов А.С., Милановский Е.Ю., Тюгай З.Н., Быкова Г.С., Кирпичников М.П., Шайтан К.В. Биосинтез сополимера поли-3-оксибутират-со-3-окси-4-метилвалерат штаммом *Azotobacter chroococcum* 7В. *Acta Naturae*. 2016;8(3):85–96. [Bonartsev A.P., Bonartseva G.A., Myshkina V.L., Voinova V.V., Mahina T.K., Zharkova I.I., Yakovlev S.G., Zernov A.L., Ivanova E.V., Akoulina E.A., Kuznetsova E.S., Zhuikov V.A., Alekseeva S.G., Podgorskii V.V., Bessonov I.V., Kopsitsyna M.N., Morozov A.S., Milanovskiy E.Y., Tyugay Z.N., Bykova G.S., Kirpichnikov M.P., Shaitan K.V. Biosintez sopolimera poli-3-oksibutirat-so-3-oksi-4-metilvalerat shtammom *Azotobacter chroococcum* 7B [Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxy-4-methylvalerate) by Strain *Azotobacter chroococcum* 7B]. *Acta Naturae*. 2016;8(3):85–96. (In Russian)].
3. Бонарцев А.П., Мураев А.А., Деев Р.В., Волков А.В. Материал-ассоциированная костная резорбция. *Современные технологии в медицине*. 2018;10(4):26–33. [Bonartsev A.P., Muraev A.A., Deyev R.V., Volkov A.V. Material-Associated bone resorption]. *Sovremennye tekhnologii v medicine [Modern technologies in medicine]*. 2018;10(4):26–33. (In Russian)]. DOI: 10.17691/stm2018.10.4.03.
4. Исакова Ю.И., Пушкарев А.И., Тарбоков В.А. Измерение состава и энергетического спектра импульсного ионного пучка времяпролетным методом высокого разрешения. *Известия Томского политехнического университета*. 2010;316(2):76–79. [Isakova Yu.I., Pushkarev A.I., Tarbokov V.A. Izmerenie sostava i energeticheskogo spektra impul'snogo ionnogo puchka vremyaproletnym metodom vysokogo razresheniya [Measurement of the composition and energy spectrum of a pulsed ion beam using a high-resolution time-of-flight method]. *Izvestiya Tomskogo politekhnicheskogo universiteta [Bulletin of the Tomsk Polytechnic University]*. 2010;316(2):76–79. (In Russian)].
5. Миронов М.М., Гребенщикова М.М., Стародумова Е.В. Исследование миграции ионов металлов с защитных наноструктурированных покрытий для имплантатов. *Вестник технологического университета*. 2016;19(20):23–26. [Mironov M.M., Grebenshchikova M.M., Starodumova E.V. Issledovanie migratsii ionov metallov s zashchitnykh nanostrukturirovannykh pokrytij dlya implantatov [Analysis of migration of metal ions from protective nanostructured coatings for implants]. *Vestnik tekhnologicheskogo universiteta [Technological University Bulletin]*. 2016;19(20):23–26. (In Russian)].
6. Мураев А.А., Бонарцев А.П., Гажва Ю.В., Рябова В.М., Волков А.В., Жаркова И.И., Стамболиев И.А., Кузнецова Е.С., Жуйков В.А., Мышкина В.Л., Махина Т.К., Бонарцева Г.А., Яковлев С.Г., Кудряшова К.С., Воинова В.В.; Шайтан К.В., Иванов С.Ю. Разработка и доклинические исследования ортотопических костных имплантатов на основе гибридной конструкции из поли-3-оксибутирата и альгината натрия. *Современные технологии в медицине*. 2016;8(4):42–50. [Muraev A.A., Bonartsev A.P., Gazhva Yu.V., Ryabova V.M., Volkov A.V., Zharkova I.I., Stamboliev I.A., Kuznetsova E.S., Zhuykov V.A., Myshkina V.L., Mahina T.K., Bonartseva G.A., Yakovlev S.G., Kudryashova K.S., Voinova V.V., Mironov A.A., Shaitan K.V., Ivanov S.Yu. Razrabotka i doklinicheskie issledovaniya ortotopicheskikh kostnykh implantatov na osnove gibridnoj konstrukcii iz poli-3-oksibutirata i al'ginata natriya [Development and preclinical studies of orthotopic bone implants based on a hybrid construction from poly(3-hydroxybutyrate) and sodium alginate]. *Sovremennye tekhnologii v medicine [Modern technologies in medicine]*. 2016;8(4):42–50. (In Russian)]. DOI: 10.17691/stm2016.8.4.06.
7. Ольхов А.А., Староверова О.В., Бонарцев А.П., Жаркова И.И., Склянчук Е.Д., Иорданский А.Л., Роговина С.З., Берлин А.А., Ищенко А.А. Структура и свойства ультраотонких волокон поли-(3-гидроксибутирата), модифицированных наночастицами кремния и диоксида титана. *Все материалы. Энциклопедический справочник*. 2014;12:2–13. [Olkhov A.A., Staroverova O.V., Bonartsev A.P., Zharkova I. I., Sklyanchuk E.D., Iordanskii A.L., Rogovina S.Z., Berlin A.A., Ishchenko A.A. Struktura i svojstva ul'tratonkikh volokon poli-(3-gidroksibutirata), modifitsirovannykh nanochasticami kremniya i dioksida titana [Structure and properties of ultra-

- thin poly-(3-hydroxybutyrate) fibers modified by silicon and titanium dioxide particles]. *Vse materialy. Enciklopedicheskij spravocnik [All materials. Encyclopedic reference]*. 2014;12:2–13. (In Russian)].
8. Параскевич В.Л. Имплантационные материалы. В кн.: *Дентальная имплантология: Основы теории и практики*. М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2011:91–96. [Paraskevich V.L. Implantacionnye materialy [Implant materials]. V kn.: *Dental'naya implantologiya: Osnovy teorii i praktiki* [In The book: Dental implantology: Mentals of theory and practice]. Moscow: Medical Information Agency Publ., 2011:91–96. (In Russian)].
 9. Петронюк Ю.С., Храмова Е.А., Левин В.М., Бонарцев А.П., Воинова В.В., Бонарцева Г.А., Мураев А.А., Асфаров Т.Ф., Гусейнов Н.А. Развитие методов акустической микроскопии для наблюдения процессов остеогенеза в регенеративной медицине. *Известия РАН. Серия физическая*. 2020;84(6):799–802, [Petronyuk Yu.S., Hramova E.A., Levin V.M., Bonarcev A.P., Voinova V.V., Bonarceva G.A., Muraev A.A., Asfarov T.F., Gusejnov N.A. Razvitie metodov akusticheskoy mikroskopii dlya nablyudeniya processov osteogeneza v regenerativnoj medicine [The development of methods of acoustic microscopy for the observing of the processes of osteogenesis in regenerative medicine]. *Izvestiya RAN. Seriya fizicheskaya [Izvestia RAN. Physical series]*. 2020;84(6):799–802. (In Russian)]. DOI: 10.31857/S0367676520060204.
 10. Тарбоков В.А., Павлов С.К., Ремнёв Г.Е., Ночовная Н.А., Ешкуллов У.Э. Комплексное модифицирование титановых сплавов. *Металлург*. 2018;11:80–84. [Tarbokov V.A., Pavlov S.K., Remnev G.E., Nochovnaya N.A., Eshkulov U.E. Komplexnoe modifizirovanie titanovykh splavov [Complex modification of titanium alloys surface]. *Metallurg [Journal Metallurgist]*. 2018;11:80–84. (In Russian)].
 11. Bonartsev A.P., Zharkova I.I., Voinova V.V., Kuznetsova E.S., Zhuikov V.A., Makhina T.K., Myshkina V.L., Potashnikova D.M., Chesnokova D.V., Khaydapova D.D., Bonartseva G.A., Shaitan K.V. Poly(3-hydroxybutyrate)/poly(ethylene glycol) scaffolds with different microstructure: the effect on growth of mesenchymal stem cells. *Biotech*. 2018;8:328. DOI: 10.1007/s13205-018-1350-8.
 12. Lütjering G. Influence of processing on microstructure and mechanical properties of (α + β) titanium alloys. *Materials Science and Engineering: A*. 1998;243(1–2):32–45.
 13. Niinomi M., Boehlert C.J. Titanium alloys for biomedical applications. *Advances in Metallic Biomaterials*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2015:179–213.
 14. Oryan A., Alidadi S., Moshiri A., Maffulli N. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. *J. Orthop. Surg. Res*. 2014;9:1–27. DOI: 10.1186/1749-799X-9-18.
 15. Sefat F., Mozafari M., Atala A. Introduction to tissue engineering scaffolds. *Handb. Tissue Eng. Scaffolds, One Elsevier*. 2019:3–22. DOI: 10.1016/B978-0-08-102563-5.00001-0.
 16. Sheremetyev V.A., Bonartsev A.P., Dubinskiy S.M., Zhukova Y.S., Bonartseva G.A., Makhina T.K., Akulina E.A., Ivanova E.V., Maria S. Kotlyarova M.S., Prokoshkin S.D., Brailovski S.D., Shaitan K.V. Surface Modification of Ti-Nb-Zr Foams by Poly(3-Hydroxybutyrate). *Materials Research Proceedings*. 2018;9:74–79. DOI: 10.21741/9781644900017-15.
 17. Ur Rahman Z, Pompa L, Haider W. Electrochemical characterization and *in vitro* bio-assessment of AZ31B and AZ91E alloys as biodegradable implant materials. *J. Sci. Mater. Med*. 2015;26(8):217. DOI: 10.1007/s10856-015-5545-9.
 18. Volkov A.V., Muraev A.A., Zharkova I.I., Voinova V.V., Akoulina E.A., Zhuikov V.A., Khaydapova D.D., Chesnokova D.V., Menshikh K.A., Dudun A.A., Makhina T.K., Bonartseva G.A., Asfarov T.F., Stamboliev I.A., Gazhva Y.V., Ryabova V.M., Zlatev L.H., Ivanov S.Y., Shaitan K.V., Bonartsev A.P. Poly(3-hydroxybutyrate)/hydroxyapatite/alginate scaffolds seeded with mesenchymal stem cells enhance the regeneration of critical-sized bone defect. *Materials Science and Engineering: C*. 2020;114:110991. DOI: 10.1016/j.msec.2020.110991.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Ешкуллов Урмат Эрнисович*, ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»;
e-mail: urmatbiy@gmail.com

Тарбоков Владислав Александрович, к.т.н., ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет»;
e-mail: tarbokovv@tpu.ru

Urmат E. Eshkulov*, The Peoples' Friendship University of Russia;
e-mail: urmatbiy@gmail.com

Vladislav A. Tarbokov, Cand. Sci. (Tech.), National Research Tomsk Polytechnic University;
e-mail: tarbokovv@tpu.ru

Иванов Сергей Юрьевич, д.м.н., проф., чл.-корр. РАН, ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет);
e-mail: syivanov@yandex.ru

Ночовная Надежда Алексеевна, д.т.н., проф., ФГУП «Всероссийский научно-исследовательский институт авиационных материалов» ГНЦ РФ;
e-mail: nochovnaya_viam@mail.ru

Дымников Александр Борисович, ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»;
e-mail: Al.dymnikov@gmail.com

Алымбаев Руслан Султанович, к.м.н., НПО «Профилактическая медицина»;
e-mail: r.alymbaev@gmail.com

Sergey Yu. Ivanov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, The Peoples' Friendship University of Russia; First Moscow State Medical University named after I.M. Sechenov of the Ministry of Health care of Russia (Sechenov University);
e-mail: syivanov@yandex.ru

Nadezhda A. Nochovnaya, Dr. Sci. (Tech.), Prof., All-Russian Scientific Research Institute of Aviation Materials;
e-mail: nochovnaya_viam@mail.ru

Alexandr B. Dymnikov, The Peoples' Friendship University of Russia;
e-mail: Al.dymnikov@gmail.com

Ruslan S. Alymbaev, Cand. Sci. (Med.), Scientific and Production Association «Preventive Medicine»;
e-mail: r.alymbaev@gmail.com

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

МЕХАНИЗМЫ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ОЛОВООРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

Е.Р. Милаева¹, М.А. Додохова^{2*}, Д.Б. Шпаковский¹, Т.А. Антоненко¹, А.В. Сафроненко²,
И.М. Котиева², Е.Ф. Комарова², Е.В. Ганцгорн², М.С. Алхусейн-Кулягинова²

¹ ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»
119991, Российская Федерация, Москва, ул. Ленинские горы, 1, стр. 3

² ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России
344022, Российская Федерация, Ростов-на-Дону, Нахичеванский пер., 29

В обзоре проанализированы данные, представленные в доступной нам медицинской и научной литературе, посвященные доклиническому изучению *in vitro* цитотоксических свойств оловоорганических соединений (ООС), а также основных механизмов их действия. Последние, в частности, заключаются во взаимодействии со свободными SH группами белков, иницировании окислительного стресса, связывании с ДНК, взаимодействии с рецепторами, а также активированием апоптоза за счет повышения экспрессии каспаз, проапоптотических белков и уменьшением антиапоптотического белка. В зависимости от донорного лиганда ООС проявляют специфическую цитотоксичность по отношению к опухолевой клеточной линии. Высокий цитотоксический потенциал ООС указывает на целесообразность их дальнейшего изучения *in vivo* и разработки в качестве кандидатов для создания лекарственных средств для противоопухолевой и антиметастатической терапии.

Ключевые слова: оловоорганические соединения, цитотоксичность, механизм противоопухолевого действия, доклинические исследования *in vitro*

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности: работа выполнена при финансовой поддержке грантов РНФ (№ 19-13-00084) и РФФИ (№ 18-03-00203, № 20-03-00471).

Для цитирования: Милаева Е.Р., Додохова М.А., Шпаковский Д.Б., Антоненко Т.А., Сафроненко А.В., Котиева И.М., Комарова Е.Ф., Ганцгорн Е.В., Алхусейн-Кулягинова М.С. Механизмы цитотоксического действия оловоорганических соединений. *Биомедицина*. 2021;17(2):88–99. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-2-88-99>

Поступила 20.02.2021

Принята после доработки 27.04.2021

Опубликована 10.06.2021

MECHANISMS OF THE CYTOTOXIC ACTION OF ORGANOTIN COMPOUNDS

Elena R. Milaeva¹, Margarita A. Dodokhova^{2*}, Dmitry B. Shpakovsky¹,
Taisiya A. Antonenko¹, Andrej V. Safronenko², Inga M. Kotieva², Ekaterina F. Komarova²,
Elena V. Gantsgorn², Margarita S. Alkhuseyn-Kulyaginova²

¹ Lomonosov Moscow State University
119991, Russian Federation, Moscow, Leninskie gory Str., 1, building 3

² Rostov State Medical University of the Ministry of Health care of Russia
344022, Russian Federation, Rostov-on-Don, Nakhichevsky Lane, 29

This review analyzed the literature data on the *in vitro* preclinical study of the cytotoxic properties of organotin compounds, as well as the main mechanisms of their action. The latter consist in interacting with

SH groups of proteins, initiating oxidative stress, binding to DNA, interacting with receptors, as well as activate apoptosis by increasing the expression of caspases, proapoptotic proteins, and decreasing antiapoptotic proteins. Organotin compounds, depending on the donor ligand, exhibit specific cytotoxicity towards certain tumor cell lines. The high cytotoxic potential indicates the possibility of further development *in vivo* and research of organotin compounds as candidates for the creation of drugs for anticancer and antimetastatic therapy.

Keywords: organotin compounds, cytotoxicity, mechanism of antitumor action, *in vitro* preclinical studies

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

Acknowledgments: this work was supported by grants from the Russian Science Foundation (No. 19-13-00084) and the Russian Foundation for Basic Research (No. 18-03-00203, No. 20-03-00471).

For citation: Milaeva E.R., Dodokhova M.A., Shpakovsky D.B., Antonenko T.A., Safronenko A.V., Kotieva I.M., Komarova E.F., Gantsgorn E.V., Alkhuseyn-Kulyaginova M.S. Mechanisms of the Cytotoxic Action of Organotin Compounds. *Journal Biomed.* 2021;17(2):88–99. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-2-88-99>

Submitted 20.02.2021

Revised 27.04.2021

Published 10.06.2021

Введение

Одной из актуальных задач медицинской химии и экспериментальной фармакологии на пути создания новых лекарственных средств (ЛС) является отбор перспективных физиологически активных соединений с помощью методик первичного скрининга. На ранних этапах тестирования того или иного вида активности, в т. ч. цитотоксической, используют модельные реакции и процессы либо *in vitro* биохимические системы, максимально приближенные к физиологическим условиям [1].

Ярким примером веществ, активно изучаемых в качестве кандидатов в разряд ЛС, являются субстанции, в состав молекул которых входит атом металла. На современном мировом фармацевтическом рынке сформировался отдельный сектор, представленный различными ЛС на основе соединений металлов (metal-based drugs).

Особый научно-практический интерес в настоящее время вызывают соединения олова, относящиеся к классу металлоорганических соединений и содержащие связи «олово—углерод». Круг этих соединений чрезвычайно обширен, а их биологическая активность *in vitro* исследована достаточно подробно. Главной характеристикой олово-

органических соединений (ООС) является высокая цитотоксичность. Но именно это свойство может быть использовано для создания противопухолевых ЛС нового поколения с механизмом действия, отличным от цисплатина.

ООС общей формулы R_nSnX_{4-n} представляют собой металлоорганические соединения, которые содержат, по крайней мере, один ковалентно связанный с атомом углерода атом олова.

Активность ООС определяется несколькими химическими структурными факторами:

- 1) природой заместителей R;
- 2) координационной доступностью атома Sn для образования связи с мишенью;
- 3) относительно стабильной связью L-Sn (например, S-Sn);
- 4) медленной гидролитической деструкцией [35].

Наличие одной или нескольких ковалентных связей C-Sn влияет на активность соединения и зависит от числа и природы алкильных заместителей (R), связанных с Sn-центром [25]. Характер действия для соединений R_nSnX_{4-n} , содержащих различные группы R (R=Me, Et, Pr и Bu), как показывает мета-анализ, зависит

от типа и числа групп R, а биологическая активность уменьшается в следующем ряду: $n\text{-Bu} > \text{Ph}$ и $\text{Et} > \text{Me}$ [35]. Вариация алкильного или арильного заместителя в ООС показала заметное влияние на биологическую активность этих соединений [18, 26]. Как правило, тризамещенные производные R_3SnX проявляют более высокую активность, чем R_2SnX_2 или RSnX_3 , тогда как R_4Sn обладают крайне высокой токсичностью. Более низкая активность производных дизамещенных соединений R_2SnX_2 может быть объяснена токсичностью лигандов и степенью гидрофильности комплексов. Показано, что производные, содержащие две органические группы R, влияют на клеточный метаболизм, а тризамещенные соединения R_3SnX способствуют переносу гидроксильных ионов через митохондриальную мембрану [12]. Важно отметить, что ООС R_3SnX , содержащие три связи Sn-C, обладают наиболее высокой цитотоксичностью, причём соединения, содержащие арильные группы, менее токсичны, чем соединения с алкильными группами [22].

Триалкил- и триарилоловоорганические соединения могут действовать как агонисты ретиноидных X рецепторов (RXR) благодаря их способности координироваться с лиганд-связывающим доменом подтипов RXR, которые могут модулировать процессы транскрипции [23].

Триоловоорганические соединения, такие как Bu_3SnCl и Ph_3SnCl , проявляют выраженный апоптотический эффект путем повышения активности каспазы, что приводит к блеббингу мембран и ядерной фрагментации с дальнейшим некрозом, а также путем экспрессии проапоптотического белка p53, и повышением экспрессии другого проапоптотического белка Bax [13]. Напротив, экспрессия антиапоптотического белка Bcl-2 значительно уменьшается уже после 24 ч инкубации с Ph_3SnCl (по сравнению с контрольными клетками

и Bu_3SnCl), в то время как ингибирующий эффект Bu_3SnCl проявляется только через 48 ч. При длительной инкубации данные соединения демонстрируют сходные цитотоксические эффекты.

Органические лиганды способствуют модуляции биологической активности и минимизируют побочные эффекты, вызванные общей токсичностью ООС. Замена лигандов, координированных с атомом Sn (IV), на цитопротекторные может привести к образованию соединений с высокой антипролиферативной активностью *in vitro* против широкого спектра опухолей и одновременно к уменьшению их общей токсичности. Такие лиганды могут включать производные никотиновой кислоты, полиокса и биологически релевантные карбоновые кислоты, стероидные кислоты, лиганды, содержащие фенольные фрагменты и основания Шиффа [5].

Группа X в соединениях $\text{R}_n\text{SnX}_{4-n}$ может увеличивать активность, если она сама обладает биологическим действием или способствует транспорту соединения к мишени, но может и снижать активность, если она хелатирована с атомом Sn (IV). Показано, что соединения со связью Sn-O обладают высокой активностью по сравнению с соединениями, в которых атом Sn связан с атомом S [11]. Фрагменты R_nSn могут легко образовывать комплексы различного состава, обладающие различной стабильностью с лигандами, содержащими донорные атомы S, N, O и P.

Целью настоящего обзора является обобщение представленных в литературе данных первичного скрининга *in vitro* ООС с различными донорными лигандами и возможных механизмов их цитотоксической активности для оценки перспектив исследования противоопухолевого и антиметастатического эффекта ООС *in vivo*.

Оловоорганические комплексы с O-донорными лигандами

Растущий в последние годы интерес к оловоорганическим карбоксилатам в значительной степени обусловлен их структурным разнообразием и широтой терапевтической активности. Противоопухолевая активность различных оловоорганических карбоксилатов подробно изучена [24].

Исследования *in vitro* (Z)-4-(4-цианофениламино)-4-оксобутил-2-еновой кислоты (LH) и ее комплекса с трифенилоловом (Ph_3SnL) выявили спонтанное связывание этих соединений с ДНК посредством интеркаляции. Экспериментальные данные для этих соединений, полученные с помощью спектральных методов и электрохимических методов (циклическая вольтамперометрия), были сопоставимы. Для Ph_3SnL продемонстрировано более прочное связывание с ДНК при 37°C и двух значениях pH (желудок — 4,7 и кровь — 7,4), причём координация оказалась стабильнее в кислой среде (pH 4,7). Связывание по механизму интеркаляции также подтверждено методом вискозиметрии, который показал тенденцию к увеличению относительной вязкости ДНК при постепенном добавлении различных концентраций соединения. При этом для обоих соединений не обнаружено антиоксидантной активности [6].

В комплексах олова с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) $\{[\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{O-HTBA})] \cdot 0,7(\text{H}_2\text{O})\}_n$ и $[(n\text{-Bu})_3\text{Sn}(\text{O-HTBA}) \cdot \text{H}_2\text{O}]$ лиганд $\text{H}_2\text{TБК}$ координирован с атомом Sn (IV) за счет связи Sn-O, в то время как атом S остается свободным. Эти соединения демонстрируют более высокую цитотоксичность, чем цисплатин: по результатам исследований, проведенных на клетках аденокарциномы молочной железы человека (MCF-7), значения концентрации полумакизмального ингибирования (IC_{50}) для них в 272 и 179 раз, соответственно, ниже, чем у цисплатина. Результаты определения цитотоксичности *in vitro* показали, что ком-

плекс $[(n\text{-Bu})_3\text{Sn}(\text{O-HTBA}) \cdot \text{H}_2\text{O}]$ проявляет более высокую активность по сравнению с $\{[\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{O-HTBA})] \cdot 0,7(\text{H}_2\text{O})\}_n$ для всех протестированных опухолевых клеточных линий человека — рак шейки матки (HeLa), рак яичников (OAW-42), инвазивный протоковый рак молочной железы (MDA-MB-231), карцинома легкого (A549), светлоклеточный рак почки (Caki-1). Результаты анализа с использованием метода точной цитометрии показали, что данные соединения не имеют избирательности воздействия, вызывая выраженный цитотоксический ответ у нормальных и атипичных клеток и остановку клеточного цикла в S-фазе. Апоптотическая гибель клеток требует прямого или косвенного взаимодействия с ДНК. Поскольку нет никаких доказательств прямого взаимодействия ООС с нуклеотидами при промежуточных значениях pH (4,0–9,5), противоопухолевая активность ООС может не включать непосредственного взаимодействия с ДНК в физиологических условиях. Напротив, обнаружено, что комплексы ингибируют окисление полиненасыщенных жирных кислот до гидропероксидов при действии фермента липоксигеназы (LOX), таким образом, взаимодействуют с ДНК косвенно. Следовательно, можно предположить, что оловоорганические комплексы с ТБК могут взаимодействовать с ферментами, которые вызывают апоптоз атипичных клеток [8].

Комплекс олова с 2-меркаптониотиновой кислотой (SnMNA) также оказался эффективным и перспективным противоопухолевым агентом в экспериментах *in vitro*. Так, обнаружена значительная антипролиферативная активность *in vitro* для двух различных линий опухолевых клеток MCF-7, причем значения IC_{50} жизнеспособности клеток и пролиферации роста были значительно ниже, чем для цисплатина. SnMNA индуцирует существенное необратимое ингибирование роста клеток,

которое сохраняется после обработки средой без него. Данный комплекс в концентрации 60 нМ индуцирует апоптоз в 66% клеток MCF-7. Апоптотическая смерть, вызванная данным комплексом, подтверждается анализом фрагментации ДНК, в котором наблюдаются фрагменты олигонуклеосомного размера. Для данного комплекса, предположительно, происходит гидролиз связи Sn-O с сохранением связи Sn-S. В результате образуется мономерный комплекс MNA и гидроксид трифенилолова, активность которого намного выше, чем для индивидуального гидроксида трифенилолова, что, в свою очередь, свидетельствует о лучшем связывании комплекса с активным сайтом мишени. Цитотоксичность карбоксилатов диметил- и дибутилолова на основе 3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксибензойной и 3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксибензилпропионовой кислот исследована по отношению к четырем типам клеточных линий человека: A-549, MCF-7, аденокарциноме толстой кишки (SW480), карциноме толстой кишки (HCT-116) и диплоидной линии клеток человека, состоящей из фибробластов (WI-38) [4].

Таким образом, при анализе данных литературы о цитотоксической активности ООС с O-донорными лигандами выявлены следующие закономерности: активность производных дибутилолова намного выше, чем у аналогичных производных диметилолова; карбоксилаты трифенилолова на основе полициклических жирных кислот проявляют более высокую активность по сравнению с аналогичными производными триметилолова; в целом липофильные тризамещенные ООС активнее, чем дизамещенные.

Оловоорганические комплексы с S-донорными лигандами

Липофильные ООС R_nSnX_{4-n} являются мембранно-активными ксенобиотиками и при накоплении в липидном бислое кле-

точных мембран могут вызывать окислительный стресс в живом организме [33]. Основной «маршрут» в этих процессах связан со стимулирующим эффектом пероксидного окисления липидов в присутствии R_nSnX_{4-n} . ООС способны взаимодействовать с пероксильными радикалами $LIPOO\bullet$, образуясь при пероксидном окислении ненасыщенных жирных кислот молекулярным кислородом, и продуцировать активные органические радикалы $R\bullet$ вследствие гомолитического расщепления связей Sn-C в реакциях радикального замещения с участием R_nSnX_{4-n} .

Оловоорганический комплекс $[Ph_3Sn(cmbzt)]_2(SnCMB)$ (CMB) = 5-хлор-2-меркаптобензотиазол) продемонстрировал выраженные цитотоксическое, антимиастатическое и противоопухолевое действия. Значения IC_{50} почти в 200 раз ниже (155 нМ), чем для цисплатина (32,8 мМ) на клетках леймиосаркомы (LMS). Соединение проявило умеренную цитотоксичность на клетках нормальных фибробластов легких плода человека (MRC-5), которая проявлялась при концентрациях, превышающих 250 нМ. Клеточная пролиферация MRC-5 при значении IC_{50} для клеток LMS (155 нМ) снизилась на 17% по сравнению с контролем. Однако, несмотря на то, что значение IC_{50} для опухолевых клеток оказалось чрезвычайно низким, комплекс способен вызывать сильное обратимое ингибирование роста клеток, сохраняющееся после обработки средой без него только в дозах, более чем в 15 раз превышающих значение IC_{50} . Следовательно, для полного подавления пролиферации клеток необходимы более высокие дозы соединения, поскольку при низких концентрациях клетки проявляют лекарственную устойчивость [21].

Исследованы комплексы Ph_3SnL с двумя производными тионов — 4,6-диамин-пиримидин-2-тионом Ph_3Sn (DAPMT) и с имидазолидин-2-тионом Ph_3Sn (HIMT)Cl. Была

измерена цитотоксичность комплексов после 48-ми ч инкубации на клеточных опухолевых линиях HeLa, MCF-7 и SK-LMS-1 и нормальных фибробластах человека, выделенных из легких (CCD39Lu). Изменения в клеточной морфологии можно было наблюдать уже через 24 ч обработки. Результаты показали, что оба комплекса обладают выраженной цитотоксической активностью. Важно отметить, что сами лиганды (DAMPT, HMIT) неактивны в исследуемом диапазоне концентраций, в то время как оба комплекса обладают сходной активностью. Соединения наиболее эффективны в отношении клеток SK-LMS-1 ($IC_{50}=0,1 \mu\text{M}$), что важно, поскольку доступные в настоящее время методы лечения лейомиосаркомы неэффективны. Оба комплекса обладают избирательной цитотоксичностью, а именно — относительно нормальных клеток — в 4 раза и в 3 раза, соответственно, более активны в случае SK-LMS-1, чем для CCD39Lu: IC_{50} составляет 0,4 и 0,34 μM , соответственно [17]. Такая селективность редко встречается для ООС и перспективна в случае рассматриваемого соединения в качестве кандидата в химиотерапевтические агенты.

Соединения на основе бис (3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенил)олова с гетероциклическими тиамидами — 2-меркаптопиримидином (PMTN), 2-меркапто-4-метилпиримидином (MPMTN), 2-меркаптопиридином (PYTN), 2-меркаптобензотиазолом (MBZTN) — были протестированы на цитотоксичность *in vitro* в отношении MCF-7. Соединения проявили более высокую цитотоксическую активность, чем цисплатин. Противоопухолевая активность этого ряда соединений зависит от природы тиамида и наличия затрудненного фенольного фрагмента, способного образовывать относительно стабильные феноксильные радикалы [31].

Биологическая активность соединений Sn (IV) с 2,6-ди-*трет*-бутил-4-меркапто-

фенолом оценивалась на раковых клеточных линиях MCF-7 и HeLa и сравнивалась с нормальными клетками линии MRC-5. Наибольшая активность в отношении обеих опухолевых клеточных линий была определена для комплекса трифенилолова со значениями IC_{50} 250 нМ (MCF-7) и 160 нМ (HeLa). Высокая антипролиферативная активность объясняется высокой липофильностью и способностью взаимодействовать с SH-группами тубулина, что влияет на митотическую активность. В данном исследовании показано, что введение цитопротекторной фенольной группы снижало цитотоксичность соединений, и была достигнута некоторая селективность, более выраженная цитотоксичность в отношении злокачественных клеток по сравнению с нормальными [32].

Оловоорганические комплексы с N-донорными лигандами

Модификация молекул ООС путем введения углеводного фрагмента может привести к увеличению растворимости молекулы и минимизации неспецифичной токсичности. Проводятся исследования, посвященные синтезу новых хелатных производных сахаридов, обеспечивающие возможность связывания и повышения стабильности образующихся комплексов металлов. Например, одним из лигандов является D-глюкозамин, применяемый в качестве пищевой добавки. Преимущество такого подхода заключается в том, что для агента становятся доступны углеводные транспортные и метаболические пути в организме.

Противоопухолевую активность комплексов с глюкозаминами *in vitro* определяли посредством скрининга 20-ти различных клеточных линий карциномы человека различного гистологического происхождения. Соединения показали выраженную цитотоксическую активность только в отношении клеточной линии карциномы ротовой

полости человека (DWD) при значении IC_{50} < 10 μ M [34].

ООС на основе 5,7-ди-*тпет*-бутил-1,2,4-триазоло [1,5-а] пиримидина (dbtp) и 5,7-дифенил-1,2,4-триазоло [1,5-а] пиримидина (dptp) продемонстрировали дозозависимый антипролиферативный эффект в отношении клеток гепатоцеллюлярной карциномы (HepG2), HeLa и MCF-7. Как правило, цитотоксичность соединений соответствует порядку Bu>Ph>Et>Me в отношении атипичных клеток. Производные бутил- и фенилолова ингибируют рост клеток в S-фазе, вызывая апоптоз, значения IC_{50} лежат в диапазоне 0,3–1,2 μ M [7].

Искаженные октаэдрические одноядерные соединения Sn (IV) 4'-pN, N-бис (2-гидроксиэтил) бензил-2,2': 6,2''-терпиридин и 4'-p-9-антраценвинил-2,2': 6,2''-терпиридин демонстрируют более высокую или сходную цитотоксичность в отношении клеточных линий HeLa и MCF-7 по сравнению с цисплатином [30].

В ряде данных соединений производное монометилолова проявляет более высокую активность. Учитывая, что ООС с одной фенильной группой проявляет сходную активность с соответствующим дизамещенным производным, активность соединений монометилолова следует связывать с их более низкой липофильностью.

Имины, или основания Шиффа, являются универсальными лигандами в координационной химии ввиду простоты их синтеза, широкого биомедицинского применения и способности образовывать стабильные комплексы с оловом. В ряду ароматических оснований Шиффа производные пиридоксаля и их комплексы с металлами вызывают интерес ввиду их высокой противоопухолевой активности. Пиридоксальфосфат является биологически активной формой витамина B_6 , действующей в качестве кофермента в биосинтетических и регуляторных процессах. В присутствии ионов металлов пиридоксаль может катализировать

важные метаболические реакции (переаминоирование, декарбоксилирование и рацемизация аминокислот) [27].

ООС (IV) с основаниями Шиффа 2,2'-{пиридин-2,6-диилбис [(E) метанилиден (E) азанилилиден]}дифенолята, были протестированы в отношении клеток колоректальной аденокарциномы, типа С (HCT-15), MCF-7, миелогенного лейкоза (K562), глиобластомы человека (U251), рака простаты (PC-3) и аденокарциномы легкого человека (SKLU-1). Соединения проявляют более высокую активность, чем цисплатин (до 52 раз), по отношению к клеточной линии K562. Диапазон IC_{50} составляет 0,29–5,30 μ M в случае линии клеток K562. Наименьшее значение IC_{50} демонстрирует ООС, в молекулах которого группы Cl и NO_2 находятся в ароматическом кольце [16].

Дизамещенные ООС N- (2-пиридилметил)ариламина оценивали на панели клеточных линий, таких как почечная карцинома человека (A498), аденокарцинома молочной железы (EVSA-T), немелкоклеточная карцинома легкого человека (H226), рак яичника человека (IGROV), меланома человека (M19 MEL), MCF7 и рак толстой кишки человека (WIDR).

Показано, что цитотоксический потенциал зависит от природы группы при атоме олова и длин связей Sn-N (при более длинных связях соединения проявляют более высокую активность). Диапазон значений IC_{50} составляет от 0,003 до 4,82 μ M [10].

Цитотоксичность комплексов с основаниями Шиффа, имеющих общие фрагменты пиридоксаля и фенола, была изучена *in vitro* на пяти линиях рака человека: U-251, K-562, HCT-15, MCF-7 и SKLU-1. Основные структурные различия в этих молекулах заключаются во введении в ароматическое кольцо заместителей в двух различных положениях аминафенольной части, а также в природе органической группы при атоме олова (Bu, Ph). Данные

по активности после 48-ми ч культивирования показали, что все производные пиридоксаля были значительно более цитотоксичны, чем цисплатин, используемый в качестве положительного контроля. Отмечено, что присутствие нитрогруппы или атома галогена (F, Cl) в ароматическом кольце приводит к повышению активности ООС. Биоизостерическая замена Н на F обуславливает возрастание активности для линий НСТ-15, К-562 и SKLU-1, в отличие от замены атома S на O, что уменьшает цитотоксичность. Анализ влияния заместителей в положениях С-8 и С-9 ароматического кольца для комплексов дибутилолова показал, что присутствие электроакцепторных групп увеличивает активность для всех протестированных клеточных линий. Кроме того, присутствие нитрогруппы в положении С-9 для четырех клеточных линий (за исключением К-562) показывает самую высокую ингибирующую активность по сравнению с комплексами с нитрогруппой в положении 8. Производные фенилолова были менее токсичны, чем комплексы. Кроме того, комплексы, замещенные в положении 8, были более токсичными, чем в положении 9. Более низкая токсичность наблюдалась также для комплексов, которые содержали нитрогруппу и обладали более высокой цитотоксичностью по отношению к клеточным линиям U-251, НСТ-15, MCF-7 и SKLU-1 [14].

Октаэдрические дизамещенные оловоорганические комплексы с основаниями Шиффа, полученные из 7-метокси-2-гидрокси-1-нафталальдегида, 1,2-фенилендиамин и салицилальдегида, испытаны в отношении клеточной линии рака носоглотки (КВ). Комплекс диэтилолова показал наиболее высокую цитотоксичность ($IC_{50}=0,35 \mu M$) в отношении клеток КВ, сопоставимую с цисплатином. Исследования показали, что соединения взаимодействуют с ДНК. Установлено, что данные комплексы

олова плотно прилегают к сайту связывания цисплатина, а энергия связывания комплекса больше, чем для цисплатина [28].

Биядерные ООС на основе арилгидразонов β -дикетона протестированы на линиях HeLa, KB и HepG2. Показано, что соединения проявляют селективность по отношению к клеткам KB. Производные диалкилолова с нитрозаместителем более активны, чем незамещенные, и значительно превышают по токсичности цисплатин в отношении клеток HeLa [29].

Заключение

Обобщение данных, представленных в доступной нам литературе, позволяет заключить, что ООС обладают высокой цитотоксической активностью. Свое токсическое действие они проявляют посредством ряда механизмов, включая ингибирование ферментов как общих, так и специфических путей клеточного метаболизма, ферментов биотрансформации органических ксенобиотиков фазы I и фазы II (тем самым препятствуя детоксикации), ингибирование выведения стероидов и агонизм с ретиноидными X рецепторами (RXR) или ультраспираклом (USP), которые обычно взаимодействуют с другими ядерными рецепторами, такими как рецептор, активируемый пролифератором пероксисом (PPAR-g) [20].

Различные исследования показывают, что ООС влияют на макромолекулы клетки (ДНК или белки), а также на энергетику клетки и функции митохондрий, взаимодействуют с клеточными мембранами, увеличивают концентрацию Ca^{2+} в цитоплазме [3]. Для большинства ООС показано, что они вызывают апоптотическую гибель клетки. Апоптоз вызывается либо за счет влияния ООС на редокс-сигнальные пути клеток (накопление активных метаболитов кислорода (АМК)), либо нарушением проницаемости мембран митохондрий, активации каспаз или ввиду взаимодействия с ДНК, уменьшением выработки анти-

апоптотического белка Bcl-2 [38]. Кроме того, ингибирование ферментов, вызванное ООС, также связано с их антипролиферативной активностью. Известно, что один из механизмов действия ООС определяется их способностью связываться с сульфгидрильными группами белка тубулина, играющего ключевую роль в формировании микротрубочек и клеточной пролиферации. В результате, нарушается репликация и транскрипция ДНК, что приводит к задержке клеточного цикла и, в конечном итоге, — к апоптозу [2, 19, 32].

ООС, несмотря на свою высокую токсичность, демонстрируют широкий спектр биологической активности, обладая уникальными характеристиками, такими как каталитическая и окислительно-восстановительная способность, структурное разнообразие, тенденция к обмену лигандов и разнообразие доступных взаимодействий с биологическими мишенями [9, 15].

На основании выполненного анализа доступной нам литературы можно резюмировать, что в зависимости от донорного лиганда ООС проявляют различную цитотоксическую активность и специфичность. В связи с этим, обнаружение специфичности действия ООС открывает перспективы

для поиска среди них химиотерапевтических средств, действующих на конкретные виды опухолей. В значительном числе проведенных *in vitro* исследований производные ООС продемонстрировали значительный цитотоксический потенциал на различных опухолевых клетках, однако их специфический механизм действия все еще остается предметом дискуссий, что указывает на целесообразность их дальнейшего изучения *in vivo* и разработки в качестве кандидатов для создания ЛС для противоопухолевой и антиметастатической терапии.

Для широкого спектра ООС установлена также противоопухолевая и/или антиметастатическая активность на стандартных и альтернативных опухолевых моделях в исследованиях *in vivo* [36, 37].

Детальный анализ соотношения структур ООС и цитотоксической активности *in vitro* и *in vivo* описанных в литературе субстанций будет использован для выбора наиболее перспективных кандидатов в противоопухолевые лекарственные средства для дальнейших собственных доклинических исследований выбранных соединений и/или направленного синтеза молекул ООС с целью получения оптимального соотношения «активность—токсичность».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Зуева Е.П., Разина Т.Г., Амосова Е.Н., Лопатина К.А., Рыбалкина О.Ю., Сафонова Е.А. Скрининговые исследования на животных в онкофармакологии: право на существование. *Информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии: мат-лы Межд. конф.* 2018:121–125. [Zueva E.P., Razina T.G., Amosova E.N., Lopatina K.A., Rybalkina O.Yu., Safonova E.A. Screening studies on animals in oncopharmacology: the right to exist]. *Information technologies in medicine, biology, pharmacology and ecology: materials of International conference.* 2018:121–125. (In Russian).
2. Мухатова Е.М., Осипова В.П., Коляда М.Н., Мовчан Н.О., Шпаковский Д.Б., Грачева Ю.А., Орлова С.И., Милаева Е.Р. Синтез и антиоксидантная активность новых оловоорганических соединений, содержащих фрагмент 2,6-ди-трет-бутилфенола. *Доклады Академии наук.* 2013;451(1):46–49. [Mukhatova E.M., Osipova V.P., Kolyada M.N., Movchan N.O., Shpakovsky D.B., Gracheva Yu.A., Orlova S.I., Milaeva E.R. Sintez i antioksidantnaya aktivnost' novykh olovoorganicheskikh soyedineniy, soderzhazhshchikh fragment 2,6-di-tret-butylfenola [Synthesis and antioxidant activity of new organotin compounds excites the 2,6-di-tret-butylphenol fragment]. *Doklady Akademii nauk [Reports of the Academy of Sciences]*. 2013;451(1):46–49. (In Russian)]. DOI: 10.7868/S0869565213190134.
3. Alama A., Tasso B., Novelli F., Sparatore F. Organometallic compounds in oncology: Implications of novel organotin as antitumor agents. *Drug Discov. Today.* 2009;14:500–508. DOI: 10.1016/j.drudis.2009.02.002.

- Antonenko T.A., Shpakovsky D.B., Berseneva D.A., Gracheva Yu A., Dubova L.G., Shevtsov P.N., Redkozubova O.M., Shevtsova E.F., Tafenko V.A., Aslanov L.A., Milaeva E.R. Cytotoxic activity of organotin carboxylates based on synthetic phenolic antioxidants and polycyclic bile acids. *J. Organomet. Chem.* 2020;909:121089. DOI: 10.1016/j.jorganchem.2019.121089.
- Antonenko T.A., Shpakovsky D.B., Vorobyov M.A., Gracheva Yu A., Kharitonashvili E.V., Dubova L.G., Shevtsova E.F., Tafenko V.A., Aslanov L.A., Iksanova A.G., Shtyrin Yu.G., Milaeva E.R. Antioxidative vs cytotoxic activities of organotin complexes bearing 2,6-di-tert-butylphenol moieties. *Appl. Organomet. Chem.* 2018;32(7):e4381. DOI: 10.1002/aoc.4381.
- Arshad N., Bhatti M.H., Farooqi S.I., Saleem S., Mirza B. Synthesis, photochemical and electrochemical studies on triphenyltin (IV) derivative of (z)-4-(4-cyanophenylamino)-4-oxobut-2-enoic acid for its binding with DNA: Biological interpretation. *Arab. J. Chem.* 2016;9(3):451–462. DOI: 10.1016/j.arabj.2014.08.018.
- Assunta Girasolo M., Attanzio A., Sabatino P., Tesoriero L., Rubino S., Stocco G. Organotin(IV) derivatives with 5,7-disubstituted-1,2,4-triazolo[1,5-a]pyrimidine and their cytotoxic activities: The importance of being conformers, *Inorg. Chim. Acta.* 2014;423:168–176. DOI: 10.3390/2Fmolecules25040859.
- Balas V.I., Verginadis I.I., Geromichalos G.D., Kourkoumelis N., Male L., Hursthouse M.B., Repana K.H., Yiannaki E., Charalabopoulos K., Bakas T. Synthesis, structural characterization and biological studies of the triphenyltin(IV) complex with 2-thiobarbituric acid. *Eur. J. Med. Chem.* 2011;46(7):2835–2844. DOI:10.1021/ic061601f.
- Banti C.N., Hadjidakou S.K., Sismanoglu T., Hadjiladis N. Anti-proliferative and antitumor activity of organotin(IV) compounds. An overview of the last decade and future perspectives. *J. Inorg. Biochem.* 2019;194:114–152. DOI:10.1016/j.jinorgbio.2019.02.003.
- Basu Baul T.S., de Vos D. In vitro cytotoxic evaluation of novel dichlorodiorganotin(IV) derivatives in human tumor cell lines. *Investig. New Drugs.* 2010;28:609–614. DOI: 10.1007/s10637-009-9300-2.
- Bouâlam M., Meunier-Piret J., Biesemans M., Willem R., Gielen M. Organotin (IV) compounds of 2-thiopyridine. crystal and molecular structure of dicyclohexyltin (iv) bis(2-pyridylthiolate). *Inorg. Chim. Acta.* 1992;198(200):249–255. DOI: 10.1016/S0020-1693(00)92367-3.
- Davies A.G., Smith P.J. *Tin in comprehensive organometallic chemistry.* Ed. by: G. Wilkinson, F.A.S. Gordon, E.W. Abel. Oxford: Pergamon Press, 1982. 519 p.
- Fickova M., Macho L., Brtko J. A comparison of the effects of tributyltin chloride and triphenyltin chloride on cell proliferation, proapoptotic P53, bax, and antiapoptotic Bcl-2 protein levels in human breast cancer MCF-7 cell line. *Toxicol. In Vitro.* 2015; 29(4):727–731. DOI: 10.1016/j.tiv.2015.02.007.
- Galván-Hidalgo J.M., Chans G.M., Ramírez-Apan T., Nieto-Camacho A., Hernández-Ortega S., Gómez E. Tin (IV) schiff base complexes derived from pyridoxal: synthesis, spectroscopic properties and cytotoxicity. *Appl. Organomet. Chem.* 2017;31(9):e3704. DOI: 10.1002/aoc.3704.
- Gasser G., Metzler-Nolte N. The potential of organometallic complexes in medicinal chemistry. *Curr. Op. Chem. Biol.* 2012;16:84–91. DOI: 10.1016/j.cbpa.2012.01.013.
- Grzešekiewicz A.M., Owczarzak A., Kucińska M., Murias M., Kubicki M. Structural peculiarities and anticancer activities of two organotin compounds. *J. Coord. Chem.* 2017;70(10):1776–1789. DOI:10.1080/00958972.2017.1316841.
- Hadjidakou S.K., Hadjiladis N. Antiproliferative and anti-tumor activity of organotin compounds. *Coord. Chem. Rev.* 2009;253:235–249. DOI: 10.1016/j.ccr.2007.12.026.
- Jenkins R.O., Craig P.J., Francesconi K.A., Harrington C.F. Environmental and biological aspects of organometallic compounds. Ed. by O'Hare. *Comprehensive Organometallic Chemistry III.* Oxford: Elsevier. 2006;11:603–661.
- McCombe Roark A. Endocrine disruptors and marine systems. *Ref. Mod. Earth Sys. Env. Sci., Encyclopedia of the World's Biomes, Elsevier Inc.* 2020;188–194.
- Metsios A., Verginadis I., Simos Y., Batistatou A., Peschos D., Ragos V., Vezyraki P., Evangelou A., Karkabounas S. Cytotoxic and anticancer effects of the triorganotin compound [(C₆H₅)₃Sn(Cmbzt)]: An in vitro, ex vivo and in vivo study. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2012;47(2):490–496. DOI: 10.1016/j.ejps.2012.07.011.
- Mushak P., Krigman M.R., Mailman R.B. Comparative organotin toxicity in the developing rat: somatic and morphological changes and relationship to accumulation of total tin. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 1982;4(2):209–215.
- Nakanishi T. Endocrine disruption induced by organotin compounds; organotins function as a powerful agonist for nuclear receptors rather than an aromatase inhibitor. *J. Toxicol. Sci.* 2008;33(3):269–276. DOI:10.2131/jts.33.269.
- Navakoski de Oliveira K., Andermark V., Onambelle L.A., Dahl G., Prokop A., Ott I. Organotin complexes containing carboxylate ligands with maleimide and naphthalimide derived partial structures: TrxR inhibition, cytotoxicity and activity in resistant cancer cells.

- Eur. J. Med. Chem.* 2014;87:794–800. DOI:10.1016/j.ejmech.2014.09.075.
25. Pellerito C., Nagy L., Pellerito L., Szorcik A. Biological activity studies on organotin(IV) n^+ -complexes and parent compounds. *J. Organomet. Chem.* 2006;691:1733–1747. DOI:10.1016/j.jorganchem.2005.12.025.
 26. Pellerito L., Nagy L. Organotin (IV) n^+ -complexes formed with biologically active ligands: Equilibrium and structural studies, and some biological aspects. *Coord. Chem. Rev.* 2002;224:111–150. DOI: 10.1016/S0010-8545(01)00399-X.
 27. Phillips R.S. Chemistry and diversity of pyridoxal-5'-phosphate dependent enzymes. *Biochim. Biophys. Acta.* 2015;1854(9):1167–1174. DOI:10.1016/j.bbapap.2014.12.028.
 28. Rehman W., Yasmeen R., Rahim F., Waseem M., Guo C.-Y., Hassan Z., Rashid U., Ayub K., Synthesis biological screening and molecular docking studies of some tin (IV) Schiff base adducts. *J. Photochem. Photobiol.* 2016;164:65–72. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2016.09.018.
 29. Shang X., Zhao B., Xiang G., Guedes da Silva M.F.C., Pombeiro A.J.L. Dimeric diorganotin (IV) complexes with arylhydrazones of β -diketones: synthesis, structures, cytotoxicity and apoptosis properties. *RSC Adv.* 2015;5:45053–45060. DOI:10.1039/C5RA06658A.
 30. Shi P.-F., Jiang Q., Duan H.-C., Wang D.-Q. Synthesis, characterization and cytotoxicity of fluorescent organotin complexes of terpyridine derivatives. *Chin. Chem. Lett.* 2014;25:586–588. DOI:10.1016/j.ccl.2014.01.049.
 31. Shpakovsky D.B., Banti C.N., Beaulieu-Houle G., Kourkoumelis N., Manoli M., Manos M.J., Tasiopoulos A.J., Hadjikakou S.K., Milaeva E.R., Charalabopoulos K., Bakas T., Butler I.S., Hadjiliadis N. Synthesis, structural characterization and in vitro inhibitory studies against human breast cancer of the bis-(2,6-di-tert-butylphenol)tin(IV) dichloride and its complexes. *Dalton Trans.* 2012;41:14568–14582. DOI:10.1039/C2DT31527K.
 32. Shpakovsky D.B., Banti C.N., Mukhatova E.M., Gracheva Yu A., Osipova V.P., Berberova N.T., Albov D.V., Antonenko T.A., Aslanov L.A., Milaeva E.R., Hadjikakou S.K. Synthesis, antiradical activity and in vitro cytotoxicity of novel organotin complexes based on 2,6-di-tert-butyl-4-mercaptophenol. *Dalton Trans.* 2014;43(18):6880–6890. DOI: 10.1039/C3DT53469C.
 33. Stohs S.J., Bagchi D. Oxidative Mechanisms in the Toxicity of Metal Ions. *Free Rad. Biol. Med.* 1995;18(2):321–336. DOI:10.1016/0891-5849(94)00159-h.
 34. Tabassum S., Khan R.A., Arjmand F., Sen S., Kayal J., Juvekar A.S., Zingde S.M. Synthesis and characterization of glycoconjugate tin (IV) complexes: in vitro DNA binding studies, cytotoxicity, and cell death. *J. Organomet. Chem.* 2011;696(8):1600–1608. DOI:10.1016/j.jorganchem.2011.01.012.
 35. Tabassum S., Yadav S., Arjmand F., Exploration of glycosylated-organotin (IV) complexes as anticancer drug candidates. *Inorg. Chim. Acta.* 2014;423:38–45. DOI:10.1016/j.ica.2014.07.080.
 36. Verginadis I., Karkabounas S., Simos Y., Kontargiris E., Hadjikakou S.K., Batistatou A., Evangelou A., Charalabopoulos K. Anticancer and cytotoxic effects of a triorganotin compound with 2-mercapto-nicotinic acid in malignant cell lines and tumor bearing Wistar rats. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2011;42(3):253–261. DOI: 10.1016/j.ejps.2010.11.015.
 37. Verginadis I., Metsios A., Simos Y., Batistatou A., Peschos D., Ragos V., Vezyraki P., Evangelou A., Karkabounas S. Cytotoxic and anticancer effects of the triorganotin compound [(C₆H₅)₃Sn(cmbzt)]: an in vitro, ex vivo and in vivo study. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2012;47(2):490–496. DOI: 10.1016/j.ejps.2012.07.011.
 38. Zhang Y.-Y., Zhang R.-F., Zhang S.-L., Cheng S., Li Q.-L., Ma C.-L. Syntheses, structures and anti-tumor activity of four new organotin(IV) carboxylates based on 2-thienylselenoacetic acid. *Dalton Trans.* 2016;45:8412–8421. DOI:10.1039/c6dt00532b.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Милаева Елена Рудольфовна, д.х.н., проф., ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»;
e-mail: helenamilaeva@mail.ru

Додохова Маргарита Авдеевна*, к.м.н., доц., ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России;
e-mail: dodohova@mail.ru

Elena R. Milaeva, Dr. Sci. (Chem.), Prof., Lomonosov Moscow State University;
e-mail: helenamilaeva@mail.ru

Margarita A. Dodokhova*, Cand. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Rostov State Medical University of the Ministry of Health care of Russia;
e-mail: dodohova@mail.ru

Шпаковский Дмитрий Борисович, к.х.н.,
ФГБОУ ВО «Московский государственный уни-
верситет имени М.В. Ломоносова»;
e-mail: dmsHPak@mail.ru

Антоненко Таисия Алексеевна, к.х.н., ФГБОУ
ВО «Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова»;
e-mail: taisIya.antonenko@mail.ru

Сафроненко Андрей Владимирович, д.м.н.,
доц., ФГБОУ ВО «Ростовский государственный
медицинский университет» Минздрава России;
e-mail: andrejsaf@mail.ru

Котиева Инга Мовлиевна, д.м.н., доц., ФГБОУ
ВО «Ростовский государственный медицинский
университет» Минздрава России;
e-mail: kukulik70@mail.ru

Комарова Екатерина Федоровна, д.б.н., проф.,
проф. РАН, ФГБОУ ВО «Ростовский государст-
венный медицинский университет» Минздрава
России;
e-mail: katitako@gmail.com

Ганцгорн Елена Владимировна, к.м.н.,
ФГБОУ ВО «Ростовский государственный ме-
дицинский университет» Минздрава России;
e-mail: gantsgorn@inbox.ru

Алхусейн-Кулягинова **Маргарита**
Стефановна, ФГБОУ ВО «Ростовский го-
сударственный медицинский университет»
Минздрава России;
e-mail: rita.kuljaginva@rambler.ru

Dmitry B. Shpakovsky, Cand. Sci. (Chem.),
Lomonosov Moscow State University;
e-mail: dmsHPak@mail.ru

Taisiya A. Antonenko, Cand. Sci. (Chem.),
Lomonosov Moscow State University;
e-mail: taisIya.antonenko@mail.ru

Andrey V. Safronenko, Dr. Sci. (Med.), Assoc.
Prof., Rostov State Medical University of the
Ministry of Health care of Russia;
e-mail: andrejsaf@mail.ru

Inga M. Kotieva, Dr. Sci. (Med.), Assoc. Prof.,
Rostov State Medical University of the Ministry of
Health care of Russia;
e-mail: kukulik70@mail.ru

Ekaterina F. Komarova, Dr. Sci. (Biol.), Prof.,
Prof. of RAS, Rostov State Medical University of
the Ministry of Health care of Russia;
e-mail: katitako@gmail.com

Elena V. Gantsgorn, Cand. Sci. (Med.), Rostov
State Medical University of the Ministry of Health
care of Russia;
e-mail: gantsgorn@inbox.ru

Margarita S. Alkhuseyn-Kulyaginova, Rostov
State Medical University of the Ministry of Health
care of Russia;
e-mail: rita.kuljaginva@rambler.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author



*Генеральному директору
НПО «Спецматериалы»*

СИЛЬНИКОВУ

Михаилу Владимировичу 60 лет

От имени коллектива Научного центра биомедицинских технологий ФМБА России и от себя лично сердечно поздравляю Вас, дорогой Михаил Владимирович, с 60-летним юбилеем!

Вы — выдающийся ученый в области взаимодействия ударных волн с гетерофазными средами, изобретатель и конструктор средств защиты нового поколения от поражающих факторов взрыва. Ваши фундаментальные исследования в области механики деформируемого тела и механики жидкости и газов открыли путь к разработке новейших материалов и высокоэффективных методов защиты, которые были оценены при избрании Вас членом Российской академии ракетных и артиллерийских наук. Широко известны Ваши достижения в создании нелетального оружия и изделий специального назначения. Не менее важны Ваши заслуги в деле защиты бойца и научный вклад в биомедицинские и медико-технические вопросы здравоохранения страны. Нам особенно приятно отметить, что эти работы сотрудники НЦБМТ выполняли вместе с Вами.

Ваши научные заслуги высоко оценены. Вы профессор, доктор наук, директор Института военно-технического обучения и безопасности Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого, Почетный доктор, заведующий кафедрой «Взрывобезопасность и технические средства противодействия терроризму», член ученого и диссертационного советов Санкт-Петербургского университета МЧС России, член Президиума РАН. В 2011 году Вас заслуженно избрали членом-корреспондентом РАН.

Ваши заслуги отмечены Государственной премией РФ, премиями Правительства России в области науки и техники, премией Президента РФ в области образования. Вы награждены орденами Почета, Александра Невского, «За военные заслуги», медалями и наградами Министерства обороны и МВД России. Вы удостоены почетного звания Заслуженный деятель науки России.

Все эти титулы и звания уравниваются на весах фортуны Вашими исключительными человеческими и деловыми качествами, верностью друзьям, бережным отношением к близким и любовью к своей семье. Желаем Вам, ученому, конструктору, производственнику, а главное — истинному патриоту нашей Родины, крепкого здоровья, успехов в работе и новых достижений.

*Главный редактор журнала «Биомедицина»,
академик РАН и Международной академии астронавтики,
член-корреспондент РАН Каркищенко Н.Н.*

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, авторы и читатели журнала «Биомедицина»!

26–27 мая 2021 года состоялась наша ежегодная научно-практическая конференция «Биомедицина и био-моделирование», на которой было представлено более 60 докладов. Мы благодарны коллегам из Ростова-на-Дону и Санкт-Петербурга за организацию очного и за-очного формата симпозиумов, а также всем авторам, приславшим видеодоклады.

Пленарное заседание в записи и материалы вы-ступлений размещены на официальном сайте НЦБМТ ФМБА России www.scbmt.ru. Все представленные для печати работы будут опубликованы в выпуске № 3–2021 журнала «Биомедицина».

В связи с увеличивающимся объёмом направляемых в журнал работ мы за-регистрировали электронную версию журнала: ISSN 2713–0428 (Online). Двух-летний импакт-фактор РИНЦ — 0,712. Журнал входит в ядро РИНЦ, цитируе-мое в Scopus и Web of Science.

