

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

ISSN 2074-5982 (print)
ISSN 2713-0428 (online)

БИОМЕДИЦИНА

SCIENTIFIC JOURNAL

JOURNAL BIOMED

Том (Vol.) 19
2023

4





Уважаемые коллеги, дорогие друзья!

Сердечно поздравляем всех с Новым годом и Рождеством!

Традиционно подводя итоги, хотелось бы особо выделить следующие наши достижения:

- по данным РИНЦ в 2022 году средний индекс Хирша наших авторов вырос на 20%;
- число просмотров статей повысилось на 71% по сравнению с предыдущими наукометрическими результатами.

Выражаем огромную благодарность и признательность всем членам редакционного совета за активное сотрудничество и многолетний труд.

Приветствуем наших авторов, доверяющих нам рукописи своих трудов, благодарим коллег из издательства «Нэйкон» за подготовку выпусков журнала и работников типографий за полиграфические услуги.

Мы с надеждой вступаем в очередной год и не меняем своих принципов: публикации статей остаются бесплатными для всех, все авторы безвозмездно получают экземпляры журнала со своей статьёй.

Напоминаем, что подписка на «Биомедицину» осуществляется онлайн через каталоги «Пресса России» и «Пресса по подписке» (подписной индекс 57995). Всем публикациям неизменно присваиваются индивидуальные префиксы DOI, что упрощает их поиск в интернет-пространстве и цитирование литературных источников, полные версии каждого выпуска журнала размещаются на нашем официальном сайте journal.scbmt.ru и цитируются в РИНЦ.

Всем друзьям нашего журнала желаем мира, здоровья и счастья!

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

ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий
ФМБА России»

БИОМЕДИЦИНА

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Издается с 2005 г.
4 выпуска в год

2023, Том 19, № 4

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

JOURNAL BIOMED

SCIENTIFIC JOURNAL

Published since 2005.
Quarterly.

2023, Vol. 19, No. 4

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, академ. 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., академ. РАН (Москва, Россия)

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

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

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

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

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

Дубина Михаил Владимирович, д.м.н., академ. РАН (Москва, Россия)

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

Еримбетов Кенес Тагаевич, д.б.н. (Боровск, Калужская обл., Россия)

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

Коваленко Леонид Владимирович, д.х.н., проф. (Москва, Россия)

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

Кузнецов Александр Евгеньевич, д.т.н., проф. (Москва, Россия)

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

Мартиросян Владимир Викторович, д.т.н., проф. РАН (Москва, Россия)

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

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

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

Остренко Константин Сергеевич, д.б.н. (Боровск, Калужская обл., 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., академ. РАН (Москва, Россия)

Сафроненко Андрей Владимирович, д.м.н., проф. (Ростов-на-Дону, Россия)

Сычёв Дмитрий Алексеевич, д.м.н., проф., академ. РАН (Москва, Россия)

Федулова Лилия Вячеславовна, д.т.н., проф. РАН (Москва, Россия)

Хритинин Дмитрий Фёдорович, д.м.н., проф., академ. РАН (Москва, Россия)

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

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

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

Щастный Анатолий Тадеушевич, д.м.н., проф. (Витебск, Республика Беларусь)

БИОМЕДИЦИНА

Biomeditsina

История издания журнала:	Журнал издается с 2005 г.
Периодичность:	4 выпуска в год
Префикс DOI:	10.33647
ISSN	2074-5982 (Print) 2713-0428 (Online)
Свидетельство о регистрации СМИ:	Журнал зарегистрирован Комитетом РФ по печати. Свидетельство о регистрации: ПИ № ФС77-21324 от 09.06.2005
Индексация:	Журнал включен в Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук
Подписной индекс:	57995 в объединенном каталоге «Пресса России»
Стоимость одного выпуска:	400 руб.
Условия распространения материалов:	Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0 License
Учредитель:	ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России» 143442, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, влд. 1
Издатель:	ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России» 143442, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, влд. 1
Редакция:	143442, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, влд. 1 Тел.: +7 (495) 561-52-64 E-mail: info@scbmt.ru , scbmt@yandex.ru
Тираж:	3000 экземпляров
Типография:	ООО «БЕАН» 603003, Нижегородская обл., Нижний Новгород, ул. Баррикад, д. 1
Дата выхода в свет:	10.12.2023

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)

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 (Moscow, Russia)

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

Kenes T. Erimbetov, Dr. Sci. (Biol.) (Borovsk, Kaluga Region, Russia)

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

Leonid V. Kovalenko, Dr. Sci. (Chem.), Prof. (Moscow, Russia)

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

Aleksandr E. Kuznetsov, Dr. Sci. (Tech.), Prof. (Moscow, Russia)

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

Vladimir V. Martirosyan, Dr. Sci. (Tech.), Prof. of the RAS (Moscow, 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. Okovityi, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Saint Petersburg, Russia)

Konstantin S. Ostrenko, Dr. Sci. (Biol.) (Borovsk, Kaluga Region, 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)

Andrey V. Safronov, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Rostov-on-Don, Russia)

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

Liliya V. Fedulova, Dr. Sci. (Tech.), Prof. 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)

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)

Anatoliy T. Shchastnyj, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Vitebsk, Republic of Belarus)

JOURNAL BIOMED

Founded:	The journal has been published since 2005.
Frequency:	Quarterly
DOI Prefix:	10.33647
ISSN	2074-5982 (Print) 2713-0428 (Online)
Mass media registration certificate:	Registered at the State Committee of the Russian Federation on Press under the number ПИ № ФС77-21324 of 09.06.2005
Indexing:	The Journal is included into the Higher Attestation Commission (HAC) list of periodicals (the list of leading per-reviewed scientific journals recommended for publishing the basic research results of doctor and candidate theses)
Subscription index:	57995 in the combined catalogue "Pressa Rossii"
Price:	400 RUR
Content distribution terms:	Content is distributed under Creative Commons Attribution 4.0 License
Founders:	Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia 143442, Russian Federation, Moscow Region, Krasnogorsk District, Svetlye Gory Village, 1
Publisher:	Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia 143442, Russian Federation, Moscow Region, Krasnogorsk District, Svetlye Gory Village, 1
Editorial office:	143442, Russian Federation, Moscow Region, Krasnogorsk District, Svetlye Gory Village, 1 Tel.: +7 (495) 561-52-64 E-mail: info@scbmt.ru , scbmt@yandex.ru
Circulation:	3000 copies
Printing house:	BEAN, LLC. 603003, Russian Federation, Nizhny Novgorod Region, Nizhny Novgorod, Barrikad Street, 1
Publication date:	10.12.2023

■ МЕТОДЫ И ТЕХНОЛОГИИ БИОМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

- В.Н. Каркищенко, И.А. Помыткин, Н.В. Петрова, И.А. Васильева,
О.В. Алимкина, Н.В. Станкова, Н.А. Ларюшина**
Оценка эффективности средств коррекции состояния животных в условиях истощающих физических нагрузок по клеточным и генетическим биомаркерам 8
- Т.В. Кириченко, Л.А. Бочкарева, Л.В. Недосугова, Ю.В. Маркина, И.А. Кузина,
Н.А. Петунина, Т.В. Толстик, А.И. Богатырева, В.А. Антонов, А.М. Маркин**
Воспалительный статус моноцитов при сахарном диабете 2 типа 25
- М.Ю. Раваева, И.В. Черетаев, Е.Н. Чуян, П.А. Галенко-Ярошевский**
Модулирующее действие низкоинтенсивного электромагнитного излучения крайне высокой частоты на тканевой окислительный метаболизм и микрогемодинамику в коже . . . 35
- ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В БИОМЕДИЦИНЕ**
- Ю.Е. Ананьева, О.А. Захарова, В.Д. Федотов, О.М. Лабынцева**
Возможность применения низкочастотного импульсного магнитного поля в качестве модификатора стресс-индуцированного состояния организма животных, вызванного введением адреналина гидрохлорида 47
- Е.И. Каторкина, И.В. Лягоскин, Е.Н. Бочарова, М.В. Болотникова, А.А. Борзов,
Н.В. Бельская, А.Е. Лисова, К.В. Ульянова, Н.К. Кудина, Н.А. Белянина,
О.М. Стрижакова, А.С. Першин, Я.А. Бахарева, П.Е. Каргополова, А.П. Васильев,
А.А. Казаров, М.В. Лыков, Р.А. Хамитов**
Сравнение иммуногенности вакцины «Гам-КОВИД-Вак» при внутримышечном и интраназальном путях введения в эксперименте 56
- О.Ю. Рыбалкина, О.В. Неупокоева, О.Л. Воронова, Т.Г. Разина, Г.И. Калинкина,
В.Ю. Андреева, Е.А. Киселева, А.А. Чурин, Е.П. Зуева, В.В. Жданов**
Генопротекторная активность антоциансодержащего комплекса *Aronia melanocarpa* 70
- БИОМЕДИЦИНСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ В КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ**
- И.А. Помыткин, В.В. Писарев, М.Е. Меркулов, Л.В. Лукиных,
М.В. Моржухина, Н.Н. Каркищенко**
Результаты клинического исследования III фазы: многоцентровое рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое в параллельных группах исследование эффективности и безопасности лекарственного препарата Дирекорд у пациентов с ишемическим инсультом в раннем восстановительном периоде 81

■ METHODS AND TECHNOLOGIES OF BIOMEDICAL RESEARCH

- Vladislav N. Karkischenko, Igor A. Pomytkin, Nataliya V. Petrova, Irina A. Vasil'eva, Oksana V. Alimkina, Nataliia V. Stankova, Nadezhda A. Laryushina**
Evaluation of Approaches for Correcting the State of Animals Under Debilitating Physical Exertion by Cellular and Genetic Biomarkers 8
- Tatiana V. Kirichenko, Leyla A. Bochkareva, Lyudmila V. Nedosugova, Yuliya V. Markina, Irina A. Kuzina, Nina A. Petunina, Taisiya V. Tolstik, Anastasia I. Bogatyreva, Valeriy A. Antonov, Alexander M. Markin**
Inflammatory Status of Monocytes in Type 2 Diabetes Mellitus 25
- Marina Yu. Ravaeva, Igor V. Cheretaev, Elena N. Chuyan, Pavel A. Galenko-Yaroshevskii**
Modulating Effect of Extremely High-Frequency Low-Intensity Electromagnetic Radiation on Tissue Oxidative Metabolism and Skin Microhemodynamics 35

■ PRECLINICAL RESEARCH IN BIOMEDICINE

- Yuliya E. Ananieva, Olga A. Zakharova, Vasiliy D. Fedotov, Olga M. Labyntseva**
Use of Low-Frequency Pulsed Magnetic Field to Modify the Stress-Induced Animal Health Caused by Epinephrine Hydrochloride 47
- Elena I. Katorkina, Ivan V. Lyagoskin, Eugenia N. Bocharova, Maria V. Bolotnikova, Anton A. Borzov, Nataliya V. Belskaya, Alena E. Lisova, Ksenia V. Ulyanova, Nataliya K. Kudina, Natalia A. Belyanina, Olga M. Strizhakova, Andrey S. Pershin, Yana A. Bahareva, Polina E. Kargopolova, Aleksander P. Vasiliev, Aleksander A. Kazarov, Maksim V. Lykov, Ravil A. Khamitov**
Comparative Immunogenicity of the Gam-COVID-Vac Vaccine Under Intranasal and Intramuscular Administration 56
- Olga Yu. Rybalkina, Oksana V. Neupokoeva, Olga L. Voronova, Tatyana G. Razina, Galina I. Kalinkina, Valeria Yu. Andreeva, Elena A. Kiseleva, Aleksey A. Churin, Elena P. Zueva, Vadim V. Zhdanov**
Genoprotective Activity of *Aronia melanocarpa* Anthocyanin-Containing Complex 70

■ BIOMEDICAL TECHNOLOGIES IN CLINICAL RESEARCH

- Igor A. Pomytkin, Vladimir V. Pisarev, Mikhail E. Merkulov, Liya V. Lukinykh, Marina V. Morzhukhina, Nikolay N. Karkischenko**
Results of Phase III Clinical Trial: a Multicenter, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Parallel Group Study of the Efficacy and Safety of Direkord in Ischemic Stroke Patients in Early Recovery Period 81



ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ СРЕДСТВ КОРРЕКЦИИ СОСТОЯНИЯ ЖИВОТНЫХ В УСЛОВИЯХ ИСТОЩАЮЩИХ ФИЗИЧЕСКИХ НАГРУЗОК ПО КЛЕТОЧНЫМ И ГЕНЕТИЧЕСКИМ БИОМАРКЕРАМ

В.Н. Каркищенко, И.А. Помыткин, Н.В. Петрова*, И.А. Васильева,
О.В. Алимкина, Н.В. Станкова, Н.А. Ларюшина

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

В данной статье описано исследование влияния некоторых препаратов на экспрессию генов, используемых в качестве молекулярных мишеней, в условиях истощающей физической нагрузки у минипигов.

В проведенном эксперименте проводилась сравнительная оценка эффективности таких средств коррекции, как БАД «МиоАктив-Спорт», липосомированный мускус кабарги, интраназальный инсулин и липосомированный препарат женьшеня в условиях истощающих физических нагрузок у минипигов с использованием выбранных биомаркеров, включающих в себя исследование лейкоцитарной фракции крови и экспрессии мРНК генов *NFE2L2* и *HMGB1* в лимфоцитах. Было доказано, что наибольшим успехом в универсальном защитном действии среди изученных препаратов обладает липосомированный мускус кабарги, который при 7-дневном курсовом приеме практически полностью предотвратил провоспалительный эффект нагрузки. При этом липосомированный мускус кабарги многократно повысил экспрессию гена *NFE2L2*, отвечающего за антиоксидантную защиту организма. По своему действию липосомированный мускус кабарги превосходил эффекты референсного препарата — инсулина, защитные эффекты которого хорошо известны из научной литературы, что делает мускус кабарги перспективным объектом для применения в области медицинской реабилитации.

Ключевые слова: клеточные и генетические биомаркеры, экспрессия мРНК генов *NFE2L2* и *HMGB1*, истощающая физическая нагрузка, оценка средств коррекции, минипиги

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Каркищенко В.Н., Помыткин И.А., Петрова Н.В., Васильева И.А., Алимкина О.В., Станкова Н.В., Ларюшина Н.А. Оценка эффективности средств коррекции состояния животных в условиях истощающих физических нагрузок по клеточным и генетическим биомаркерам. *Биомедицина*. 2023;19(4):8–24. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-19-4-8-24>

Поступила 15.07.2023

Принята после доработки 10.10.2023

Опубликована 10.12.2023

EVALUATION OF APPROACHES FOR CORRECTING THE STATE OF ANIMALS UNDER DEBILITATING PHYSICAL EXERTION BY CELLULAR AND GENETIC BIOMARKERS

Vladislav N. Karkischenko, Igor A. Pomytkin, Nataliya V. Petrova*, Irina A. Vasil'eva,
Oksana V. Alimkina, Nataliia V. Stankova, Nadezhda A. Laryushina

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

In this work, we investigate the effect of a number of pharmaceutical preparations on the expression of genes, which are used as molecular targets under the conditions of debilitating physical exercise in minipigs. In the conducted experiment, the effectiveness of the following preparations was compared: “Mio-Activ-Sport” dietary supplement, a liposomal deer musk extract, intranasal insulin, and a liposomal ginseng preparation. The selected biomarkers included the leukocyte blood fraction and mRNA expression of *NFE2L2* and *HMGB1* genes in lymphocytes. Among the studied preparations, the liposomal deer musk extract showed the highest effectiveness. Thus, during seven days of therapy, this preparation almost completely prevented the pro-inflammatory effect of physical load. At the same time, the liposomal deer musk extract led to a manyfold increase in the expression of *NFE2L2* gene, which is responsible for antioxidant defense of the organism. In terms of action, the liposomal deer musk extract outperformed insulin – the reference drug, whose protective effects are well known from the scientific literature. These findings confirm the prospects of deer musk preparations for medical rehabilitation.

Keywords: cellular and genetic biomarkers, mRNA expression, *NFE2L2* and *HMGB1* genes, debilitating exercise, drug evaluation, minipigs

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

For citation: Karkischenko V.N., Pomytkin I.A., Petrova N.V., Vasil’eva I.A., Alimkina O.V., Stankova N.V., Laryushina N.A. Evaluation of Approaches for Correcting the State of Animals under Debilitating Physical Exertion by Cellular and Genetic Biomarkers. *Journal Biomed.* 2023;19(4):8–24. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-19-4-8-24>

Submitted 15.07.2023

Revised 10.10.2023

Published 10.12.2023

Введение

Исследованиям, посвященным разработкам средств и способов поддержания достаточного уровня работоспособности человека в экстремальных условиях, уделяется много внимания. В частности, разработаны различные фармакологические средства, необходимые для восстановления после тяжелых физических нагрузок.

Спортивная тренировка — самая оптимальная и естественная модель усиленной диссимиляции как причины оксидативного стресса. Важным практическим результатом и показателем адаптации является повышение работоспособности. Оксидативный стресс в силу чрезвычайной химической активности форм кислорода приводит к различным побочным эффектам, в первую очередь таким, как усиление воспалительных процессов, что ведет к разрушению клеточных и тканевых структур и, как принято считать, к старению клеток

и организма в целом. Важнейшим участником антиоксидантной защиты во всех клетках является фактор транскрипции Nrf2 (ген *NFE2L2*), под контролем которого находятся все гены, кодирующие детоксифицирующие ферменты. Nrf2 экспрессируется во многих органах: больше всего в почках, мышцах, менее — в легких, сердце, печени и головном мозге. Наиболее изучена роль этого белка в составе редокс-чувствительной сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE, или т.н. «системы трех фаз детоксификации». При нормальных условиях, в отсутствие стресса, Nrf2 поддерживается в цитоплазме кластером белков, которые быстро его деградируют. При влиянии окислительного стресса Nrf2 не разрушается, а вместо этого переходит в ядро, где связывается с промотором ДНК и инициирует транскрипцию антиоксидантных генов и их белков.

Из всех изученных нами генов-мишеней именно *NFE2L2* наиболее полно характеризует степень физической нагрузки у модельных животных. Ранее нами было показано, что ген *NFE2L2*, кодирующий фактор транскрипции Nrf2, активно экспрессируется при физических нагрузках и может служить оценочным критерием при проведении молекулярно-генетических исследований работоспособности и выносливости у минипигов [1].

HMGB1 преимущественно локализован в ядре, где он действует как шаперон ДНК и участвует в регуляции ключевых событий, таких как образование комплексов с ДНК, изгибание ДНК, стабилизация нуклеосом, репликация ДНК, восстановление поврежденной ДНК и транскрипция генов. Однако в результате пост-трансляционных модификаций *HMGB1*, таких как ацетилирование, фосфорилирование и метилирование, ядерный *HMGB1* может переходить в цитоплазму и далее во внеклеточное пространство, где он проявляет свойства цитокина, обладая способностью связываться с рецептором конечных продуктов гликирования (RAGE), толл-подобным рецептором 4 (TLR4), а также еще с десятком других рецепторов в составе комплексов с третьими партнерами [3].

Кроме того, было показано, что ген-биомаркер *HMGB1* может быть использован для оценки влияния различных препаратов при доклинических исследованиях на лабораторных минипигах [2]. Было также показано, что истощающая физическая нагрузка вызывает кратковременное многократное повышение транскрипции гена *HMGB1* в лимфоцитах животных при увеличении числа нейтрофилов в постнагрузочном периоде (до 6 ч включительно) [3]. В совокупности эти результаты указывают на возможность использования анализа лейкоцитарной фракции крови и экспрессию мРНК генов *NFE2L2* и *HMGB1* в лимфоцитах в качестве биомаркеров, позволя-

ющих оценить индивидуальный профиль защитного действия препарата в условиях повреждающего действия истощающих физических нагрузок.

Цель работы — провести сравнительную оценку эффективности таких средств коррекции, как МиоАктив-Спорт, липосомированный мускус кабарги, интраназальный инсулин и липосомированный препарат женьшеня, в условиях истощающих физических нагрузок у минисвиней с использованием батареи биомаркеров из образца крови, включающей в себя лейкоцитарную формулу и экспрессию мРНК генов *NFE2L2* и *HMGB1* в лимфоцитах.

Материалы и методы

Животные

В работе использованы минипиги светлогорской популяции, самцы в возрасте 8–11 мес. средней массой тела $18,5 \pm 0,74$ кг ($n=16$), выведенные в ФГБУН НЦБМТ ФМБА России (Московская обл.). Животные содержались в одном помещении, в групповых станках по 4 особи, с оптимальными параметрами микроклимата и освещения для содержания крупных лабораторных животных. Использовался стандартный тип кормления — полнорационный комбикорм СК-8 (норма — 320 г/сут на голову), поение без ограничений. В день проведения теста с физической нагрузкой животных не кормили, доступ к воде не ограничивали. Исследования проводились в соответствии с Директивой ЕС 2010/63/ЕС и Базельской декларацией от 2011 года о защите животных, используемых в научных целях. Все эксперименты одобрены биоэтической комиссией ФГБУН НЦБМТ ФМБА России.

Препараты

БАД «МиоАктив-Спорт», липосомированные мускус кабарги, женьшень и инсулин были приготовлены в ФГБУН НЦБМТ ФМБА России.

Тест физической нагрузки

Тест физической нагрузки проводился с использованием беговой дорожки для животных типа Pet Treadmill wikiRUN № 3 с защитной сеткой (Россия), адаптированной для минипиггов [4]. Скорость движения беговой дорожки во время тестирования для всех животных в группе составила 5,13 км/ч. Регистрируемый показатель — время бега [5]. Тестирование проводили утром в специальном проветриваемом помещении при температуре 20°C.

Забор крови

Забор венозной крови для анализа клеточного состава, содержания лактата и анализа ПЦР проводился натошак из краниальной поллой вены.

Общий анализ крови

Общий анализ крови проводился на автоматическом гематологическом анализаторе Mindray BC-3600 с последующим микрокопированием мазка крови.

Определение лактата в крови

Лактат определяли с использованием тест-полосок StatStrip Lactate Test Strips («NOVA Biomedical»).

Выделение лимфоцитов

Фракцию лимфоцитов выделяли из полученных образцов крови центрифугированием с использованием фиколл-урографина (плотность — 1,077 г/мл) [6].

Выделение РНК

Для выделения тотальной РНК из лимфоцитов были использованы наборы РНК-Экстран («Синтол», Россия) в соответствии с инструкциями фирмы-производителя. Для получения комплементарной ДНК (кДНК) были использованы наборы Реверта-Л («АмплиСенс», Россия). Для определения морфологических параметров крови изготавливались мазки на предметном стекле, окрашивание осуществлялось с помощью краски Leukodif 200 («Erba Lachema», Чехия), микрокопирование производилось на микроскопе МТ4300L («Meiji Techno», Япония).

ПЦР в реальном времени

Анализ ПЦР выполняли на матрице ДНК, полученной в результате обратной транскрипции одноцепочечной РНК в кДНК. Синтез первой цепи кДНК проводили согласно инструкции «Комплект реагентов для получения кДНК на матрице РНК «РЕВЕРТА-Л» при 37°C — 30 мин в течение одного цикла. Исследование экспрессии гена *HMGB1* в исследуемых пробах проводилось с помощью детектирующего амплификатора CFX-96 («BioRad», США) с использованием специфических праймеров и флуоресцентных зондов, указанных в табл. 1. В качестве референсного гена был выбран ген «домашнего хозяйства» *GAPDH*. Полученные результаты нормировали на среднее значение экспрессии гена до нагрузки.

Группы животных и план исследования

План исследования показан на рис. 1. 16 животных было рандомизировано в 4 группы по 4 животных в каждой. В день окончания первой контрольной сессии животные начали получать препараты один раз в день в течение 7 последующих дней: в первой группе — БАД «МيوАктив-Спорт» (МА) в дозе 18 г на животное перорально, во второй группе — мускус кабарги липосомированный (МК) в дозе 129 мг на животное перорально, в третьей — инсулин (ИН) в дозе 9 МЕ на животное интраназально, в четвертой — женьшень липосомированный (ЖШ) в дозе 58 мг на животное перорально. На следующий день после последнего введения препаратов животных тестировали во второй сессии с физической нагрузкой.

Статистический анализ

Параметры имеют следующие обозначения: М — среднее, m — стандартная ошибка, n — объем анализируемой подгруппы, p — достигнутый уровень значимости. Данные анализировали на статистическую значимость с помощью однофакторного дисперсионного анализа

Таблица 1. Олигонуклеотидные праймеры и зонды ПЦР-системы
Table 1. Oligonucleotide primers and PCR probes

Праймер/зонд	Олигонуклеотидная последовательность
<i>NFE2L2</i> sus F	5'-GGCATCACCAGAACACTCAG-3'
<i>NFE2L2</i> sus R	5'-GCATCACACACTGGAGCACT-3'
<i>NFE2L2</i> sus Z	ROX-CTATGGAGACACACTGCTTGGCTTC-BHQ ₂
<i>HMGB1</i> sus F	5'-TGAAGAGGATGAGGAGGAGG-3'
<i>HMGB1</i> sus R	5'-CCACCAGGACAGGGCTATCT-3'
<i>HMGB1</i> sus Z	ROX-AGGATGAGGAGGAAGAAGAAGATGA-BHQ ₂

ANOVA или двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA с повторяющимися измерениями с апостериорными тестами Даннетта и Сидака. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Исходные характеристики групп

Однофакторный анализ ANOVA не выявил статистически значимых различий между группами ($p > 0,05$) по исходным по-

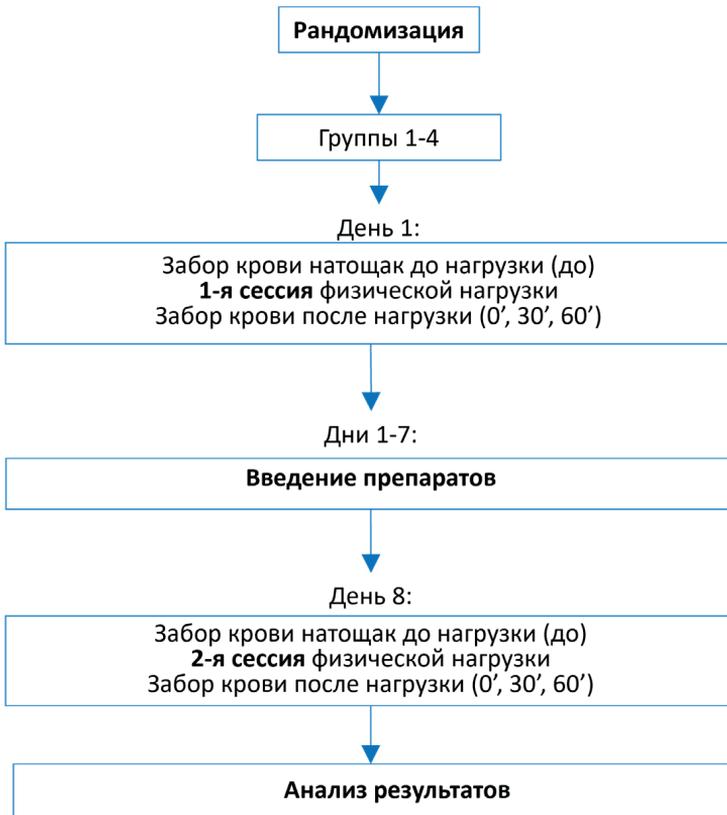


Рис. 1. План исследования.
Fig. 1. Plan of the study.

Таблица 2. Исходные характеристики животных
Table 2. Initial characteristics of animals

Параметр	Группы			
	МА	МК	ИН	ЖШ
Масса тела, кг	16,4±0,23	19,6±1,7	20,5±1,5	17,5±1,5
Нагрузка, мин	35,7±2,7	36,7±8,9	40,4±10,2	50,3±1,5

казателям массы тела и работоспособности в тесте физической нагрузки (табл. 2).

Влияние истощающей физической нагрузки на лейкоцитарную формулу

Физическая нагрузка в первой контрольной сессии (до введения препаратов) привела к однотипному острому повышению уровня лейкоцитов в крови и изменению лейкоцитарной формулы во всех исследуемых группах. Истощающая нагрузка привела к статистически значимому изменению пропорции между нейтрофилами и лимфоцитами в сторону увеличения количества нейтрофилов, что указывает на острый воспалительный процесс, связанный с физической нагрузкой (рис. 2–5А–С).

Эффект БАД «МиоАктив-Спорт» на клеточный состав крови после истощающей физической нагрузки

Двухфакторный анализ ANOVA с повторяющимися измерениями выявил статистически значимый главный эффект введения БАД «МиоАктив-Спорт» и фактора времени измерений (рис. 2А; $F_{1,6}=9,133$; $p=0,02$ и $F_{3,18}=16,04$; $p<0,0001$ соответственно), но не взаимодействия «препарат×время» ($p>0,05$) на количество лейкоцитов в крови после физической нагрузки. Апостериорный тест Даннетта показал, что физическая нагрузка статистически значимо привела к повышению количества лейкоцитов в первый час после окончания нагрузки как в первой контрольной сессии ($p<0,01$), так и во второй сессии после курсового приема препарата ($p<0,01$; $p<0,001$) по сравнению с донагрузочными значениями, причем площадь под кривой количества лейкоцитов в крови

в первый час после нагрузки была выше на 11,5% ($p<0,05$) после курсового приема тестируемого средства по сравнению с первой контрольной сессией.

Двухфакторный анализ ANOVA с повторяющимися измерениями выявил статистически значимый главный эффект введения БАД «МиоАктив-Спорт» на долю нейтрофилов и лимфоцитов (рис. 2В; $F_{1,6}=11,42$; $p=0,0149$ и рис. 2С; $F_{1,6}=8,791$; $p=0,0251$ соответственно), фактора времени измерений на долю нейтрофилов и лимфоцитов ($F_{3,18}=47,72$; $p<0,0001$ и $F_{3,18}=32,33$; $p<0,0001$ соответственно) и взаимодействия «препарат×время» на долю нейтрофилов, но не лимфоцитов ($F_{3,18}=4,505$; $p=0,0159$ и $p>0,05$ соответственно) после физической нагрузки. Апостериорный тест Даннетта показал, что физическая нагрузка статистически значимо привела к повышению доли нейтрофилов и снижению доли лимфоцитов в первый час после окончания нагрузки как в первой контрольной сессии ($p<0,0001$), так и во второй сессии после курсового приема препарата ($p<0,05$; $p<0,01$; $p<0,001$; $p<0,0001$) по сравнению с донагрузочными значениями, причем площадь под кривой нейтрофилов в первый час после нагрузки была выше на 8,7% ($p<0,05$), а лимфоцитов — ниже на 18,1% ($p<0,05$) после курсового приема тестируемого средства во второй сессии по сравнению с первой контрольной сессией.

Нагрузка не влияла на уровни тромбоцитов ($p>0,05$) и эритроцитов ($p>0,05$) в крови, а также на содержание гемоглобина ($p>0,05$) по сравнению с донагрузочными значениями.

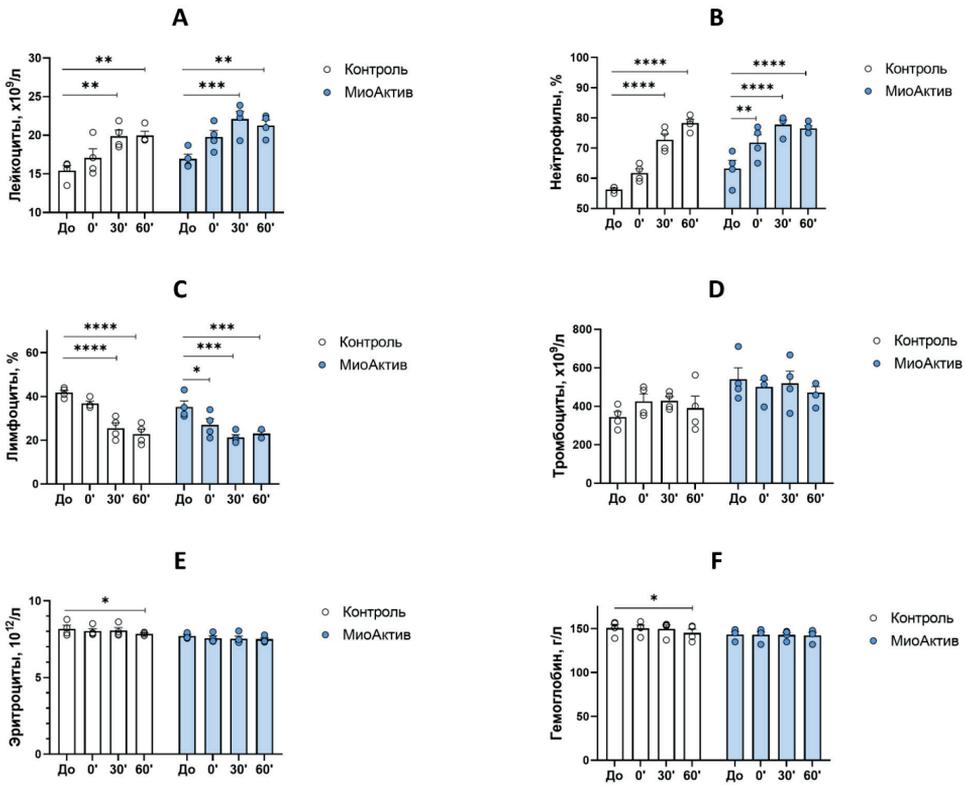


Рис. 2. Влияние физической нагрузки на количество лейкоцитов (А), процент нейтрофилов (В), процент лимфоцитов (С), количество тромбоцитов (D), эритроцитов (Е) и содержание гемоглобина (F) в крови мини-пигов до (Контроль) и после курсового приема БАД «МيوАктив-Спорт» (МيوАктив). Ось X — время до физической нагрузки, сразу после (0'), через 30 мин (30') и 60 мин (60') после окончания нагрузки.

Примечание: * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$; **** — $p < 0,0001$ по сравнению с исходным значением до нагрузки (двухфакторный анализ ANOVA с повторяющимися измерениями, апостериорный тест Даннетта).

Fig. 2. The effect of exercise on the number of leukocytes (A), the percentage of neutrophils (B), the percentage of lymphocytes (C), the number of platelets (D), erythrocytes (E) and hemoglobin content (F) in the blood of mini-pigs before (Control) and after administration of dietary supplement “MyoActiv-Sport” (MyoActive). X-axis — time before exercise, immediately after (0'), 30 minutes (30') and 60 minutes (60') after the end of the exercise.

Note: * — $p < 0.05$; ** — $p < 0.01$; *** — $p < 0.001$; **** — $p < 0.0001$ compared to baseline before exercise (two-way repeated measures ANOVA, Dunnett's post hoc test).

Эффект интраназального инсулина на клеточный состав крови после истощающей физической нагрузки

Двухфакторный анализ ANOVA с повторяющимися измерениями выявил статистически значимый главный эффект интраназального введения инсулина (рис. 4А; $F_{1,6} = 29,24$; $p = 0,0017$), времени измерений

($F_{3,18} = 63,32$; $p < 0,0001$) и взаимодействия «препарат×время» ($F_{3,18} = 23,76$; $p < 0,0001$) на количество лейкоцитов в крови после физической нагрузки.

Апостериорный тест Сидака показал, что постнагрузочные уровни лейкоцитов в крови были статистически значимо ниже во второй сессии после курсового

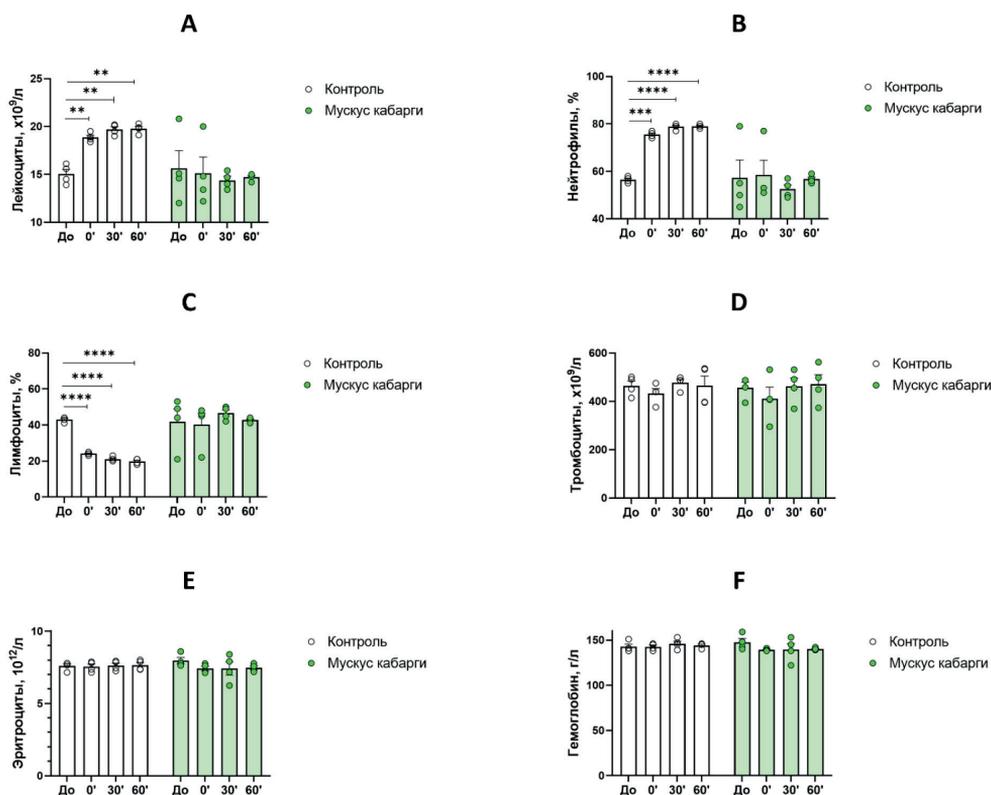


Рис. 3. Влияние физической нагрузки на количество лейкоцитов (А), процент нейтрофилов (В), процент лимфоцитов (С), количество тромбоцитов (D), эритроцитов (Е) и содержание гемоглобина (F) в крови минипигов до (Контроль) и после курсового приема препарата Мускус кабарги липосомированный (Мускус кабарги). Ось X — время до физической нагрузки, сразу после (0'), через 30 мин (30') и 60 мин (60') после окончания нагрузки.
Примечание: ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$; **** — $p < 0,0001$ по сравнению с исходным значением до нагрузки (двухфакторный анализ ANOVA с повторяющимися измерениями, апостериорный тест Даннетта).

Fig. 3. The effect of exercise on the number of leukocytes (A), the percentage of neutrophils (B), the percentage of lymphocytes (C), the number of platelets (D), erythrocytes (E) and hemoglobin content (F) in the blood of minipigs before (Control) and after administration of liposomal Musk deer (Musk deer). X-axis — time before exercise, immediately after (0'), 30 minutes (30') and 60 minutes (60') after the end of the exercise.

Note: ** — $p < 0.01$; *** — $p < 0.001$; **** — $p < 0.0001$ compared to baseline before exercise (two-way repeated measures ANOVA, Dunnett's post hoc test).

введения инсулина сразу после нагрузки ($p < 0,0001$) и через 30 мин после нагрузки ($p < 0,05$) по сравнению с соответствующими контрольными значениями первой сессии.

Апостериорный тест Даннетта показал, что физическая нагрузка статистически значимо привела к повышению количест-

ва лейкоцитов в первый час после окончания нагрузки как в первой контрольной сессии ($p < 0,0001$), так и во второй сессии после курсового приема инсулина ($p < 0,0001$) по сравнению с донагрузочными значениями, причем площадь под кривой количества лейкоцитов в крови в первый час после нагрузки была ниже на 24,6%

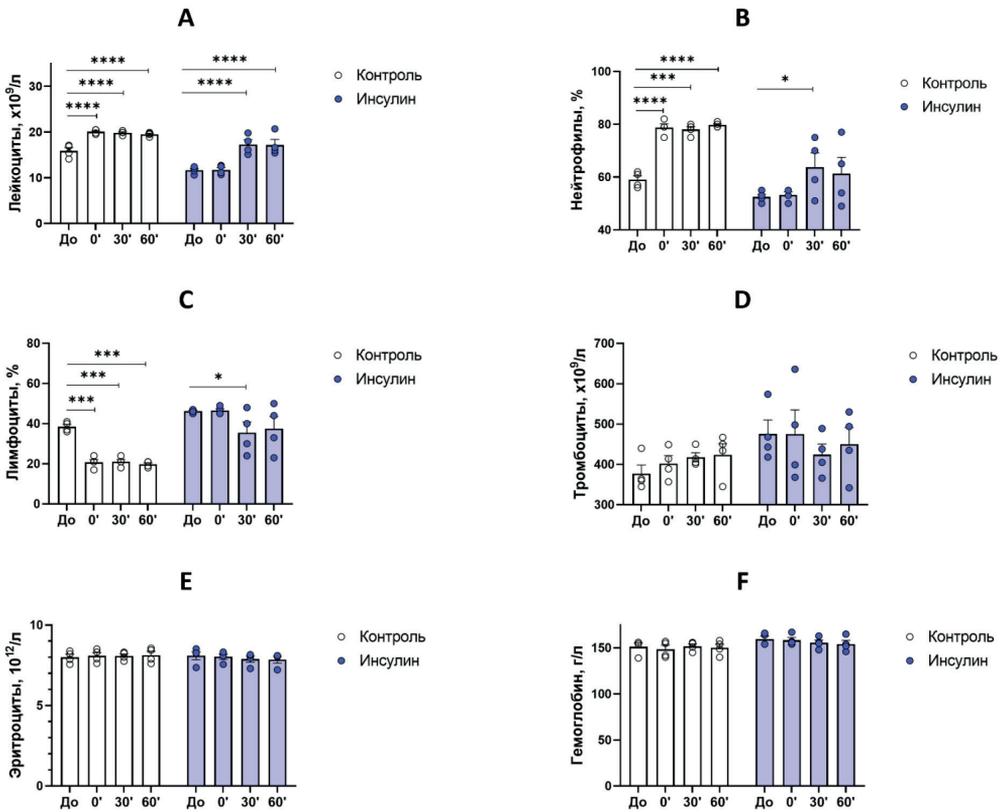


Рис. 4. Влияние физической нагрузки на количество лейкоцитов (А), процент нейтрофилов (В), процент лимфоцитов (С), количество тромбоцитов (D), эритроцитов (Е) и содержание гемоглобина (F) в крови мини-пигов до (Контроль) и после курсового приема препарата Инсулин интраназальный (Инсулин). Ось X — время до физической нагрузки, сразу после (0'), через 30 мин (30') и 60 мин (60') после окончания нагрузки.

Примечание: * — $p < 0,05$; *** — $p < 0,001$; **** — $p < 0,0001$ по сравнению с исходным значением до нагрузки (двухфакторный анализ ANOVA с повторяющимися измерениями, апостериорный тест Даннетта).

Fig. 4. The effect of exercise on the number of leukocytes (A), the percentage of neutrophils (B), the percentage of lymphocytes (C), the number of platelets (D), erythrocytes (E) and hemoglobin content (F) in the blood of mini-pigs before (Control) and after administration of intranasal Insulin (Insulin). X-axis — time before exercise, immediately after (0'), 30 minutes (30') and 60 minutes (60') after the end of the exercise.

Note: * — $p < 0,05$; *** — $p < 0,001$; **** — $p < 0,0001$ compared to baseline before exercise (two-way repeated measures ANOVA, Dunnett's post hoc test).

($p < 0,01$) после курсового приема инсулина по сравнению с первой контрольной сессией.

Двухфакторный анализ ANOVA с повторяющимися измерениями выявил статистически значимый главный эффект введения препарата, фактора времени изме-

рений и взаимодействия «препарат×время» на долю нейтрофилов (рис. 4В; $F_{1,6} = 26,23$; $p = 0,0022$; $F_{3,18} = 16,49$; $p < 0,0001$ и $F_{3,18} = 5,253$; $p = 0,0088$ соответственно) и лимфоцитов (рис. 4С; $F_{1,6} = 30,68$; $p = 0,0015$; $F_{3,18} = 14,64$; $p < 0,0001$ и $F_{3,18} = 4,728$; $p = 0,0133$ соответ-

венно) в составе лейкоцитов после физической нагрузки.

Апостериорный тест Сидака показал, что, хотя доли нейтрофилов и лимфоцитов в составе лейкоцитов до нагрузки не отличались между сессиями ($p > 0,05$), доли нейтрофилов были статистически значимо ниже после нагрузки ($0'$ — $p < 0,0001$; $30'$ — $p < 0,05$ и $60'$ — $p < 0,01$), а доли лимфоцитов были статистически значимо выше после нагрузки ($0'$ — $p < 0,0001$; $30'$ — $p < 0,01$ и $60'$ — $p < 0,01$) у животных после курсового приема препарата по сравнению с соответствующими контрольными значениями первой сессии.

Апостериорный тест Даннетта показал, что, хотя физическая нагрузка статистически значимо привела к повышению доли нейтрофилов ($0'$ — $p < 0,0001$; $30'$ — $p < 0,001$ и $60'$ — $p < 0,0001$) и снижению доли лимфоцитов ($0'$ — $p < 0,001$; $30'$ — $p < 0,001$ и $60'$ — $p < 0,001$) в первый час после окончания первой контрольной сессии по сравнению с донагрузочными значениями, у животных, получавших интраназальный инсулин, повышение нейтрофилов было не таким выраженным ($30'$ — $p < 0,05$), как и снижение доли лимфоцитов ($30'$ — $p < 0,05$) в сравнении с донагрузочными значениями, причем площадь под кривой доли нейтрофилов была ниже на 23,1% ($p < 0,01$), а доли лимфоцитов — на 74,8% выше ($p < 0,01$) у животных после курсового приема инсулина, чем в первой контрольной сессии. Нагрузка не влияла на уровни тромбоцитов ($p > 0,05$) и эритроцитов ($p > 0,05$) в крови, а также на содержание гемоглобина ($p > 0,05$) по сравнению с донагрузочными значениями.

Эффект липосомированного женьшеня на клеточный состав крови после истощающей физической нагрузки

Двухфакторный анализ ANOVA с повторяющимися измерениями выявил статистически значимый главный эффект времени измерений (рис. 5А; $F_{3,18} = 31,27$; $p < 0,0001$),

но не эффект введения липосомированного женьшеня ($p > 0,05$), и взаимодействия «препарат×время» ($p > 0,05$) на количество лейкоцитов в крови после физической нагрузки.

Апостериорный тест Даннетта показал, что физическая нагрузка статистически значимо привела к повышению количества лейкоцитов в первый час после окончания нагрузки как в первой контрольной сессии ($p < 0,01$; $p < 0,001$), так и во второй сессии после курсового приема препарата ($p < 0,01$; $p < 0,001$) по сравнению с донагрузочными значениями, причем площадь под кривой количества лейкоцитов в крови в первый час после нагрузки была незначимо ниже на 0,2% ($p > 0,05$) после курсового приема липосомированного женьшеня по сравнению с первой контрольной сессией.

Двухфакторный анализ ANOVA с повторяющимися измерениями выявил статистически значимый главный эффект фактора времени измерений на долю нейтрофилов (рис. 5В; $F_{3,18} = 39,58$; $p < 0,0001$) и лимфоцитов (рис. 5С; $F_{3,18} = 38,64$; $p < 0,0001$), но не эффект введения препарата ($p > 0,05$) и взаимодействия «препарат×время» ($p > 0,05$) после физической нагрузки. Апостериорный тест Даннетта показал, что физическая нагрузка статистически значимо привела к повышению доли нейтрофилов и снижению доли лимфоцитов в первый час после окончания нагрузки как в первой контрольной сессии ($p < 0,001$; $p < 0,0001$), так и во второй сессии после курсового приема препарата ($p < 0,01$; $p < 0,001$; $p < 0,0001$) по сравнению с донагрузочными значениями, причем площадь под кривой нейтрофилов в первый час после нагрузки была незначимо ниже на 3,1% ($p > 0,05$), а лимфоцитов — незначимо выше на 9,2% ($p > 0,05$) после курсового приема препарата женьшеня по сравнению с первой контрольной сессией.

Нагрузка не влияла на уровни тромбоцитов ($p > 0,05$) и эритроцитов ($p > 0,05$) в крови, а также на содержание гемоглобина

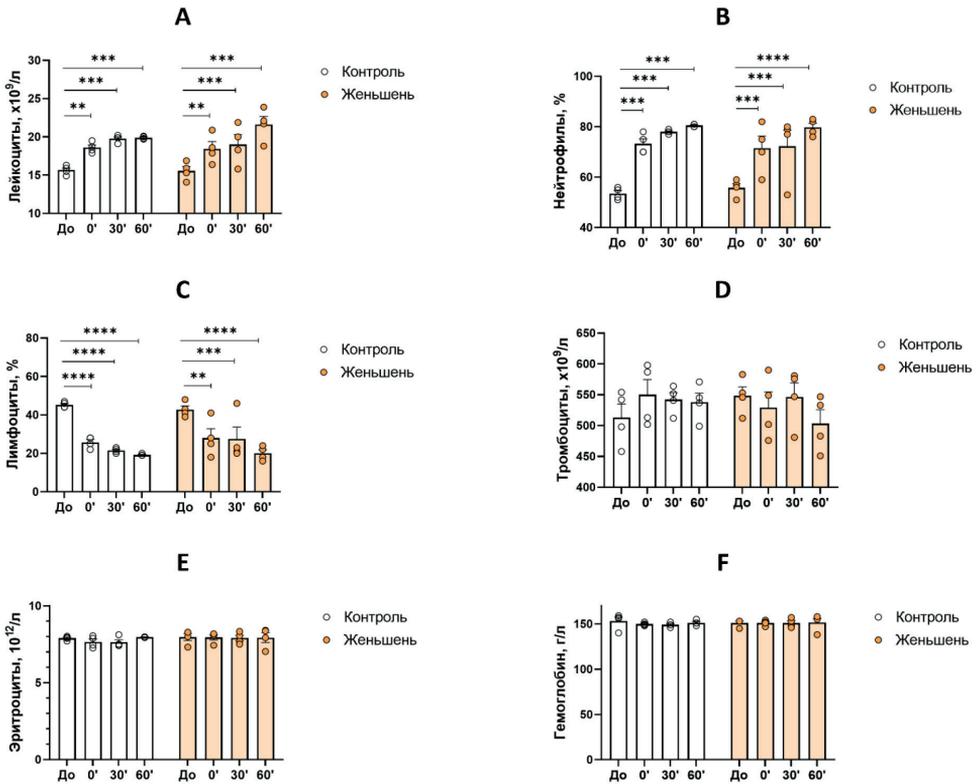


Рис. 5. Влияние физической нагрузки на количество лейкоцитов (А), процент нейтрофилов (В), процент лимфоцитов (С), количество тромбоцитов (D), эритроцитов (Е) и содержание гемоглобина (F) в крови мини-пигов до (Контроль) и после курсового приема препарата Женьшень липосомированный (Женьшень). Ось X — время до физической нагрузки, сразу после (0'), через 30 мин (30') и 60 мин (60') после окончания нагрузки.

Примечание: ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$; **** — $p < 0,0001$ по сравнению с исходным значением до нагрузки (двухфакторный анализ ANOVA с повторяющимися измерениями, апостериорный тест Даннетта).

Fig. 5. The effect of exercise on the number of leukocytes (A), the percentage of neutrophils (B), the percentage of lymphocytes (C), the number of platelets (D), erythrocytes (E) and hemoglobin content (F) in the blood of mini-pigs before (Control) and after administration of liposomal Ginseng (Ginseng). X-axis — time before exercise, immediately after (0'), 30 minutes (30') and 60 minutes (60') after the end of the exercise.

Note: ** — $p < 0.01$; *** — $p < 0.001$; **** — $p < 0.0001$ compared to baseline before exercise (two-way repeated measures ANOVA, Dunnett's post hoc test).

($p > 0,05$) по сравнению с донагрузочными значениями.

Эффект препаратов на уровень лактата в крови у мини-пигов до и после истощающей физической нагрузки

Двухфакторный анализ ANOVA с повторяющимися измерениями не выявил статистически значимых отличий в уровнях

лактата в крови мини-пигов (рис. 6; $p > 0,05$) между первой контрольной сессией физической нагрузки до приема препаратов и второй сессией после приема БАД «МيوАктив-Спорт» (А), мускуса кабарги липосомированного (В), женьшеня липосомированного (С) и инсулина интраназального (D).

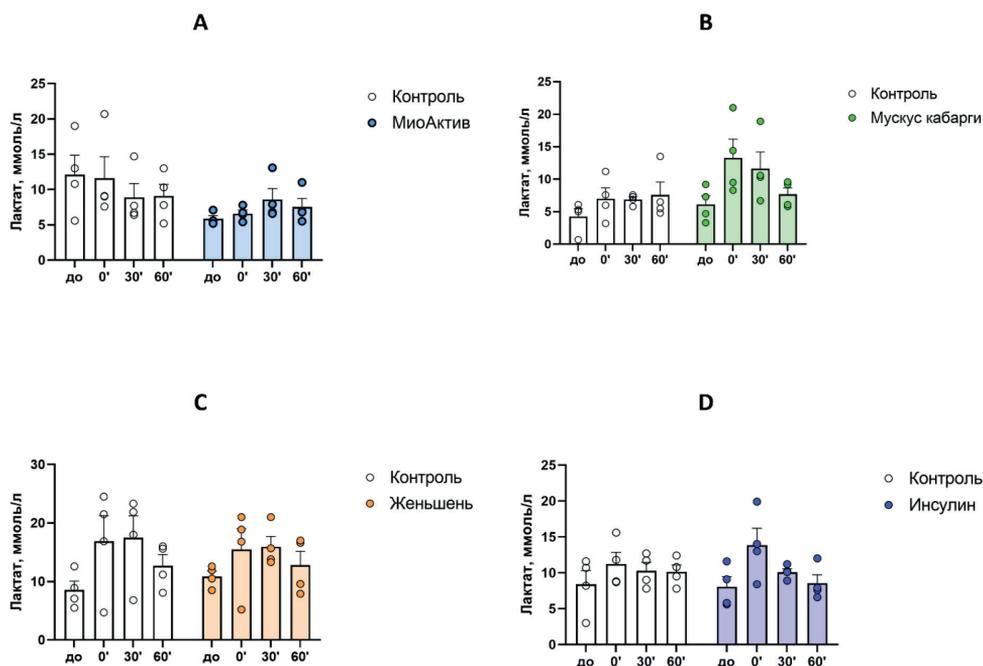


Рис. 6. Влияние физической нагрузки на уровень лактата в крови минипигов до (Контроль) и после курсового приема БАД «МيوАктив-Спорт» (А), мускуса кабарги липосомированного (В), женьшеня липосомированного (С) и инсулина интраназального (D). Ось X — время до физической нагрузки, сразу после (0'), через 30 мин (30') и 60 мин (60') после окончания нагрузки.

Fig. 6. The effect of exercise on the levels of lactate in the blood of mini-pigs before (Control) and after the course of administration of dietary supplement “MyoActiv-Sport” (A), liposomal musk deer (B), liposomal ginseng (C), and intranasal insulin (D). X-axis — time before exercise, immediately after (0'), 30 minutes (30') and 60 minutes (60') after the end of the exercise.

Эффект препаратов на экспрессию гена *NFE2L2* в лимфоцитах минипигов после истощающей физической нагрузки

Двухфакторный анализ ANOVA с повторяющимися измерениями выявил статистически значимый главный эффект БАД «МيوАктив-Спорт» (рис. 7А; $F_{1,6}=15,48$; $p=0,0077$) на экспрессию мРНК гена *NFE2L2* в лимфоцитах минипигов после физической нагрузки, причем площадь под кривой экспрессии мРНК в ходе второй сессии АУСдо-60' (после курсового приема тестируемого средства) была 3,1 раза выше,

чем площадь экспрессии этого гена в первой контрольной сессии.

Двухфакторный анализ ANOVA с повторяющимися измерениями выявил статистически значимый главный эффект мускуса кабарги липосомированного (рис. 7В; $F_{1,6}=7,987$; $p=0,0301$) на экспрессию мРНК гена *NFE2L2* в лимфоцитах минипигов после физической нагрузки, причем площадь под кривой экспрессии мРНК в ходе второй сессии АУСдо-60' (после курсового приема препарата) была 4,1 раза выше, чем площадь экспрессии этого гена в первой контрольной сессии.

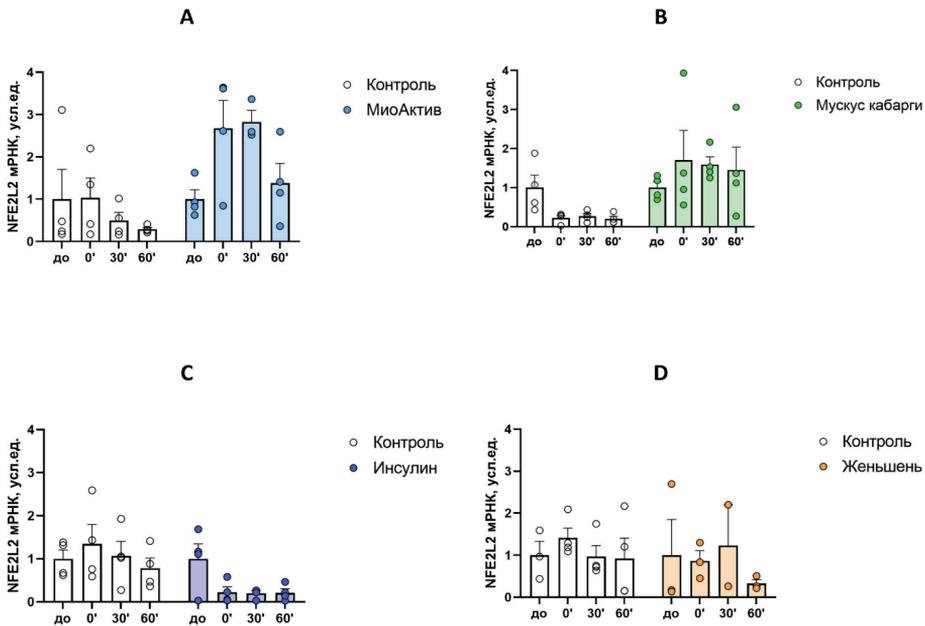


Рис. 7. Влияние физической нагрузки на уровень экспрессии гена *NFE2L2* мРНК в лимфоцитах мини-пигов до (Контроль) и после курсового приема БАД «МيوАктив-Спорт» (А), мускуса кабарги липосомированного (В), инсулина интраназального (С) и женьшеня липосомированного (D). Ось X — время до физической нагрузки, сразу после (0'), через 30 мин (30') и 60 мин (60') после окончания нагрузки.

Fig. 7. The effect of exercise on the levels of expression of gene *NFE2L2* mRNA in the lymphocytes of mini-pigs before (Control) and after the course of administration of dietary supplement “MyoActiv-Sport” (A), liposomal musk deer (B), intranasal insulin (C), and liposomal ginseng (D). X-axis — time before exercise, immediately after (0'), 30 minutes (30') and 60 minutes (60') after the end of the exercise.

Двухфакторный анализ ANOVA с повторяющимися измерениями выявил статистически значимый главный эффект интраназального инсулина (рис. 7С; $F_{1,6}=10,92$; $p=0,0163$) на экспрессию мРНК гена *NFE2L2* в лимфоцитах мини-пигов после физической нагрузки, причем площадь под кривой экспрессии мРНК в ходе второй сессии АUCдо-60' (после курсового приема препарата) была 3,2 раза ниже, чем площадь экспрессии этого гена в первой контрольной сессии.

Двухфакторный анализ ANOVA с повторяющимися измерениями не выявил статистически значимых различий между экспрессией мРНК гена *NFE2L2* в лимфоцитах мини-пигов после физической нагрузки у животных, получавших женьшень

липосомированный ($p>0,05$), по сравнению с экспрессией этого гена в первой контрольной сессии до применения препарата.

Эффект препаратов на экспрессию гена *HMGB1* в лимфоцитах мини-пигов после истощающей физической нагрузки

Двухфакторный анализ ANOVA с повторяющимися измерениями не выявил статистически значимого главного эффекта БАД «МيوАктив-Спорт» (рис. 8А; $p=0,9154$) на экспрессию мРНК гена *HMGB1* в лимфоцитах мини-пигов после физической нагрузки, причем площадь под кривой экспрессии мРНК в ходе второй сессии АUCдо-60' (после курсового приема тестируемого средства) составляла 0,98 от площади экспрессии этого гена в первой контрольной сессии.

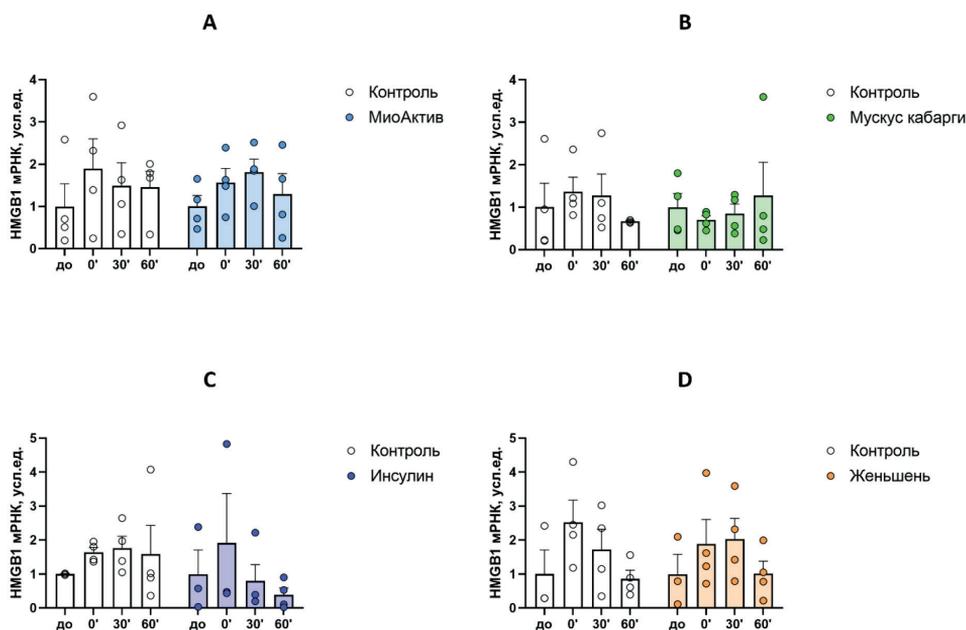


Рис. 8. Влияние физической нагрузки на уровень экспрессии гена *HMGB1* мРНК в лимфоцитах минипигов до (Контроль) и после курсового приема БАД «МيوАктив-Спорт» (А), мускуса кабарги липосомированного (В), инсулина интраназального (С) и женьшеня липосомированного (D). Ось X — время до физической нагрузки, сразу после (0'), через 30 мин (30') и 60 мин (60') после окончания нагрузки.

Fig. 8. The effect of exercise on the levels of expression of gene *HMGB1* mRNA in the lymphocytes of mini-pigs before (Control) and after the course of administration of dietary supplement “MyoActiv-Sport” (A), liposomal musk deer (B), intranasal insulin (C), and liposomal ginseng (D). X-axis — time before exercise, immediately after (0'), 30 minutes (30') and 60 minutes (60') after the end of the exercise.

Двухфакторный анализ ANOVA с повторяющимися измерениями не выявил статистически значимого главного эффекта мускуса кабарги липосомированного (рис. 8B; $p=0,7572$) на экспрессию мРНК гена *HMGB1* в лимфоцитах минипигов после физической нагрузки, причем площадь под кривой экспрессии мРНК в ходе второй сессии AUCдо-60' (после курсового приема препарата) составляла 0,77 от площади экспрессии этого гена в первой контрольной сессии.

Двухфакторный анализ ANOVA с повторяющимися измерениями не выявил статистически значимого главного эффекта инсулина интраназального (рис. 8C; $p=0,3323$) на экспрессию мРНК гена *HMGB1* в лимфоцитах минипигов после

физической нагрузки, причем площадь под кривой экспрессии мРНК в ходе второй сессии AUCдо-60' (после курсового приема препарата) составляла 0,73 от площади экспрессии этого гена в первой контрольной сессии.

Двухфакторный анализ ANOVA с повторяющимися измерениями не выявил статистически значимого главного эффекта женьшеня липосомированного (рис. 8D; $p=0,9136$) на экспрессию мРНК гена *HMGB1* в лимфоцитах минипигов после физической нагрузки, причем площадь под кривой экспрессии мРНК в ходе второй сессии AUCдо-60' (после курсового приема препарата) составляла 0,95 от площади экспрессии этого гена в первой контрольной сессии.

Таблица 3. Эффект препаратов на биомаркеры в условиях истощающей физической нагрузки у мини-пигов
Table 3. The effect of drugs on biomarkers under conditions of exercise in mini-pigs

Препарат	Биомаркеры				
	Лейкоцитарные фракции крови			Экспрессия мРНК в лимфоцитах	
	лейкоциты	нейтрофилы	лимфоциты	<i>NFE2L2</i>	<i>HMGB1</i>
БАД «МиоАктив-Спорт»	–	–	–	+	–
Мускус кабарги липосомированный	+	+	+	+	–
Инсулин интраназальный	+	+	+	–	–
Женьшень липосомированный	–	–	–	–	–

Примечание: «+» — защитный эффект, связанный со статистически значимым снижением количества лейкоцитов, снижением доли нейтрофилов, повышением доли лимфоцитов, повышением экспрессии мРНК *NFE2L2*, снижением экспрессии мРНК *HMGB1*; «-» — отсутствие защитного эффекта, определенного выше.
Note: “+” — protective effect associated with a statistically significant decrease in the number of leukocytes, a decrease in the proportion of neutrophils, an increase in the proportion of lymphocytes, an increase in the expression of *NFE2L2* mRNA, and a decrease in the expression of *HMGB1* mRNA; “-” — no protective effect as defined above.

Заключение

Истощающая физическая нагрузка вызывает повышение числа лейкоцитов в крови, измеряемое в течение первого часа после прекращения нагрузки, которое сопровождается повышением доли нейтрофилов и снижением доли лимфоцитов в лейкоцитарной фракции крови. Приведение данных показателей к донагрузочным значениям может служить критерием оценки эффективности средств коррекции.

Эффекты исследованных препаратов на указанные выше биомаркеры суммированы в табл. 3.

Сравнение тестируемых средств показывает, что наиболее универсальным защитным действием в условиях истощающей физической нагрузки обладает мускус кабарги липосомированный, курсовой

прием которого препятствует развитию постнагрузочного воспаления, связанного с подъемом лейкоцитов и, в особенности, нейтрофилов в крови после нагрузки. Препарат мускуса повышает экспрессию гена *NFE2L2*, отвечающего за эффективность антиоксидантной системы организма и биогенез митохондрий.

Инсулин интраназальный при курсовом применении также был эффективен в подавлении постнагрузочного воспаления согласно клеточным маркерам, но не генам-маркерам.

БАД «МиоАктив-Спорт» показал защитное действие только по увеличению экспрессии гена-маркера *NFE2L2*.

Женьшень липосомированный не обладал защитным действием в условиях истощающей физической нагрузки ни по одному из тестируемых биомаркеров.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

- Каркищенко В.Н., Петрова Н.В., Станкова Н.В., Слободенюк В.В., Алимкина О.В., Кулакова М.И., Васильева И.А. Исследование и оценка молекулярно-генетических признаков экспрессии гена *NFE2L2* при адаптации к физическим нагрузкам у мини-пигов. *Биомедицина*. 2020;16(1):42–52. [Karkischenko V.N., Petrova N.V., Stankona N.V., Slobodenyuk V.V., Alimkina O.V., Kulakova M.I., Vasil'eva I.A. Issledovanie i ocenka molekulyarno-geneticheskikh priznakov ekspressii gena *NFE2L2* pri adaptacii k fizicheskim nagruzkam u mini-pigov [Study and evaluation of molecular genetic signs of the *NFE2L2* gene expression during adaptation to physical loads in mini pigs]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2020;16(1):42–52. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-16-1-42-55.
- Каркищенко В.Н., Петрова Н.В., Слободенюк В.В., Ларюшина Н.А. Применение молекулярно-биологических методов оценки экспрессии цитокинов и сиртуинов в биомоделировании предельных

- физических нагрузок спортсменов. *Биомедицина*. 2021;17(3):10–16. [Karkischenko V.N., Petrova N.V., Slobodenyuk V.V., Laryushina N.A. Primenenie molekulyarno-geneticheskikh metodov otsenki ekspressii tsitokinov i sirtuinov v modelirovanii predelnykh fizicheskikh nagruzok sportsmenov [Application of Biomolecular Methods for Estimating Cytokine and Sirtuin Expression in Biosimulation of Ultimate Physical Load of Athletes]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2021;17(3):10–16. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-17-3-10-16.
3. Каркищенко В.Н., Помыткин И.А., Петрова Н.В., Станкова Н.В., Алимкина О.В., Фокин Ю.В., Зубалий А.М., Ларюшина Н.А., Васильева И.А. Истощающая физическая нагрузка вызывает многократное повышение транскрипции гена *HMGB1* в лимфоцитах мини-пигов. *Биомедицина*. 2022;18(1):22–31. [Karkischenko V.N., Pomytkin I.A., Petrova N.V., Stankova N.V., Alimkina O.V., Fokin Yu.V., Zubaliy A.M., Laryushina N.A., Vasil'eva I.A. Istoschayushaya fizicheskaya nagruzka vyzivaet mnogokratnoye povyschenye transkripsii gena *HMGB1* v limfotsitakh mini-pigov [Exhausting Physical Exercise Causes a Multiple Increase in the Transcription of *HMGB1* Gene in Mini Pigs' Lymphocytes]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2022;18(1):22–31. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-18-1-22-31
4. Станкова Н.В., Савина М.А. Непрямой субмаксимальный нагрузочный тест PWC170 определения физической работоспособности на светлогорских мини-свиньях. *Биомедицина*. 2021;17(3E):89–94. [Stankova N.V., Savina M.A. Nepryamoj submaksimal'nyj nagruzochnyj test PWC170 opredeleniya fizicheskoy rabotosposobnosti na svetlogorskikh minisvin'yax [Indirect submaximal load test PWC170 for determining physical performance on Svetlogorsk mini pigs]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2021;17(3E):89–94. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2713-0428-17-3E-89-94.
5. Шустов Е.Б., Фокин Ю.В., Капанадзе Г.Д., Берзин И.А., Станкова Н.В., Алимкина О.В., Матвеев Е.Л., Петрова Н.В. Сезонная динамика показателей физической работоспособности лабораторных животных. *Биомедицина*. 2016;1:66–73. [Shustov E.B., Fokin Yu.V., Kapanadze G.D., Berzin I.A., Stankova N.V., Alimkina O.V., Matveyenko E.L., Petrova N.V. Sezonnaya dinamika pokazatelej fizicheskoy rabotosposobnosti laboratornykh zhivotnykh [Seasonal dynamics of indicators of physical performance of laboratory animals]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2016;1:66–73. (In Russian)].
6. Boyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scand. J. Clin. Lab. Investig.* 1968;21(Suppl 97):1–9.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

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

Помыткин Игорь Анатольевич, к.х.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: ipomytkin@mail.ru

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

Васильева Ирина Андреевна, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: rozhsstul@mail.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

Igor A. Pomytkin, Cand. Sci. (Chem.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: ipomytkin@mail.ru

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

Irina A. Vasil'eva, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: rozhsstul@mail.ru

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

e-mail: alimkina@scbmt.ru

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

e-mail: alimkina@scbmt.ru

Станкова Наталия Владимировна, к.б.н.,
ФГБУН «Научный центр биомедицинских тех-
нологий ФМБА России»;

e-mail: snv@scbmt.ru

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

e-mail: snv@scbmt.ru

Ларюшина Надежда Андреевна, ФГБУН
«Научный центр биомедицинских технологий
ФМБА России»;

e-mail: kichi09@mail.ru

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

e-mail: kichi09@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

ВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ СТАТУС МОНОЦИТОВ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 2 ТИПА

Т.В. Кириченко¹, Л.А. Бочкарева², Л.В. Недосугова², Ю.В. Маркина^{1,*},
И.А. Кузина², Н.А. Петунина², Т.В. Толстик¹, А.И. Богатырева¹,
В.А. Антонов³, А.М. Маркин¹

¹ Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына
ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского»
119991, Российская Федерация, Москва, Абрикосовский пер., 2

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

³ ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены,
токсикологии и профпатологии» ФМБА России
Российская Федерация, Волгоград, ул. им. Землячки, 12

В настоящее время хроническое воспаление считается одним из ключевых факторов развития сахарного диабета (СД) 2 типа. Нарушение толерантности воспалительного ответа моноцитов рассматривается как важный механизм патогенеза хронического воспаления. Целью данного исследования явилось изучение воспалительной активации и толерантности иммунного ответа моноцитов при СД. В исследование были включены 40 пациентов с впервые выявленным СД и 40 участников контрольной группы. Уровень базальной, ЛПС-стимулированной и повторно стимулированной секреции цитокинов ФНО- α , ИЛ-1 β и МСР-1 оценивали в культуре моноцитов, изолированных из крови методом иммуномагнитной сепарации CD14⁺ клеток. Уровень базальной, ЛПС-стимулированной и повторно стимулированной секреции ФНО- α был достоверно выше у пациентов с СД, уровень секреции ИЛ-1 β не отличался достоверно между группами, базальная и повторно стимулированная секреция МСР-1 также была достоверно выше в группе СД. Повторно стимулированная секреция ФНО- α и ИЛ-1 β была снижена по сравнению с первично стимулированной секрецией в обеих группах, что демонстрирует толерантность иммунного ответа макрофагов в отношении этих цитокинов. Повторно стимулированная секреция МСР-1 у 42% пациентов с СД была выше первично стимулированной секреции; таким образом, выявлено нарушение толерантности иммунного ответа макрофагов. Обнаружена корреляция секреции ФНО- α с индексом массы тела (ИМТ), $r=0,631$, $p<0,001$, и с уровнем гликемии, $r=0,427$, $p=0,037$. Результаты исследования демонстрируют воспалительную активацию моноцитов с гиперсекрецией ФНО- α и МСР-1, нарушение толерантности иммунного ответа моноцитов при СД в отношении секреции МСР-1, а также корреляцию секреции ФНО- α с ИМТ и уровнем гликемии, что свидетельствует о важной роли ФНО- α и МСР-1 в патогенезе хронического воспаления при СД 2 типа и позволяет рассматривать данные цитокины в качестве потенциальных терапевтических мишеней для патогенетической терапии СД 2 типа.

Ключевые слова: сахарный диабет, воспалительные цитокины, моноциты, толерантность иммунного ответа

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: работа выполнена в рамках гранта Российского научного фонда № 22-25-00149.

Для цитирования: Кириченко Т.В., Бочкарева Л.А., Недосугова Л.В., Маркина Ю.В., Кузина И.А., Петунина Н.А., Толстик Т.В., Богатырева А.И., Антонов В.А., Маркин А.М. Воспалительный статус моноцитов при сахарном диабете 2 типа. *Биомедицина*. 2023;19(4):25–34.

<https://doi.org/10.33647/2074-5982-19-4-25-34>

Поступила 01.09.2023

Принята после доработки 01.11.2023

Опубликована 10.12.2023

INFLAMMATORY STATUS OF MONOCYTES IN TYPE 2 DIABETES MELLITUS

Tatiana V. Kirichenko¹, Leyla A. Bochkareva², Lyudmila V. Nedosugova²,
Yuliya V. Markina^{1,*}, Irina A. Kuzina², Nina A. Petunina², Taisiya V. Tolstik¹,
Anastasia I. Bogatyreva¹, Valeriy A. Antonov³, Alexander M. Markin¹

¹ A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology
of B.V. Petrovsky National Research Centre of Surgery
119991, Russian Federation, Moscow, Abrikosovskiy Lane, 2

² I.M. Sechenov Moscow State Medical University (Sechenov University)
119991, Russian Federation, Moscow, Trubetskaya Str., 8, Build. 2

³ Research Institute of Hygiene, Toxicology and Occupational Pathology
of the Federal Medical and Biological Agency of Russia
400048, Russian Federation, Volgograd, Str. named after Zemlyachki, 12

Chronic inflammation is considered as a key factor in the development of type 2 diabetes mellitus. Impaired tolerance of the inflammatory response of monocytes is regarded as an important mechanism in the pathogenesis of chronic inflammation. In this work, we study the inflammatory activation and tolerance of the immune response of monocytes in diabetes. In total, 40 patients with newly diagnosed diabetes and 40 control group participants were included in the study. The level of basal, LPS-stimulated and re-stimulated secretion of the TNF- α , IL-1 β , and MCP-1 cytokines was assessed in a monocyte culture isolated from the blood by immunomagnetic separation of CD14+ cells. The level of basal, LPS-stimulated and re-stimulated TNF- α secretion was significantly higher in patients with diabetes; the level of IL-1 β secretion did not differ significantly between the groups; basal and re-stimulated MCP-1 secretion was also significantly higher in the diabetes group. Re-stimulated secretion of TNF- α and IL-1 β was reduced compared to primary-stimulated secretion in both groups, demonstrating the tolerance of the macrophage immune response to these cytokines. Re-stimulated secretion of MCP-1 in 42% of diabetes patients was higher than primary stimulated secretion, thus revealing an impaired tolerance of the immune response of macrophages. A correlation was found between TNF- α secretion and body mass index, $r=0.631$, $p<0.001$, and with glycemic level, $r=0.427$, $p=0.037$. The results obtained demonstrate inflammatory activation of monocytes with hypersecretion of TNF- α and MCP-1, impaired tolerance of the immune response of monocytes in diabetes regarding the secretion of MCP-1, as well as a correlation of TNF- α secretion with body mass index and glycemic level. This indicates an important role of TNF- α and MCP-1 in the pathogenesis of chronic inflammation in type 2 diabetes, thus allowing these cytokines to be considered as potential therapeutic targets for pathogenetic therapy of type 2 diabetes.

Keywords: diabetes mellitus, inflammatory cytokines, monocytes, immune tolerance

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

Funding: the work was supported with grant of Russian Science Foundation No. 22-25-00149.

Для цитирования: Kirichenko T.V., Bochkareva L.A., Nedosugova L.V., Markina Yu.V., Kuzina I.A., Petunina N.A., Tolstik T.V., Bogatyreva A.I., Antonov V.A., Markin A.M. Inflammatory Status of Monocytes in Type 2 Diabetes Mellitus. *Journal Biomed.* 2023;19(4):25–34. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-19-4-25-34>

Submitted 01.09.2023

Revised 01.11.2023

Published 10.12.2023

Введение

По данным Международной федерации диабета, более 537 млн чел. в мире страдают сахарным диабетом (СД), при этом распространенность диабета с каждым годом неуклонно растет [9]. В настоящее время хроническое воспаление считается одним из ключевых патогенетических механизмов развития СД 2 типа [12]. Макрофаги играют важную роль в патогенезе инсулинорезистентности при СД 2 типа за счет продукции воспалительных цитокинов, которые, в свою очередь, поддерживают воспаление путем вовлечения новых иммунных клеток (моноцитов, нейтрофилов), поляризации Т-клеток и активации фибробластов [16]. Известно, что при ожирении происходит изменение клеточного состава жировой ткани, при этом количество макрофагов может увеличиваться до 50% за счет рекрутинга циркулирующих моноцитов и пролиферации тканевых макрофагов [10]. Для макрофагов жировой ткани при ожирении характерна поляризация по воспалительному фенотипу, которая является важным фактором, инициирующим развитие инсулинорезистентности [5]. Было показано, что тканевые макрофаги являются чрезвычайно мощными медиаторами передачи сигналов инсулина. Современные исследования демонстрируют данные о внутриклеточных сигнальных путях, активируемых воспалительными и стрессовыми реакциями, которые могут ингибировать передачу сигналов инсулина, что является основным механизмом развития инсулинорезистентности [6].

В настоящее время нарушение толерантности иммунного ответа моноцитов и макрофагов считается важным патогенетическим механизмом развития хронического воспаления [19]. Воспалительная активация клеток врожденного иммунитета и нарушение толерантности иммунного ответа могут быть важными патогенетическими факторами развития СД 2 типа, а также его осложнений, в т.ч. сопутствующих сердеч-

но-сосудистых заболеваний, ассоциированных с атеросклерозом [17].

Целью данного исследования явилось изучение воспалительной активации и толерантности иммунного ответа моноцитов при СД 2 типа, которые оценивали по уровню базальной и стимулированной секреции воспалительных цитокинов в первичной культуре моноцитов пациентов с СД 2 типа по сравнению с условно здоровыми участниками контрольной группы, а также оценка взаимосвязи воспалительного статуса моноцитов с клиническими характеристиками участников исследования.

Материалы и методы

Дизайн исследования

Критериями исключения из исследования были возраст младше 50 и старше 70 лет, а также наличие тяжелых хронических заболеваний и сопутствующих состояний, которые могли повлиять на результаты оценки, а именно хронические инфекционные, аутоиммунные и онкологические заболевания, а также хроническая сердечно-сосудистая, почечная, печеночная недостаточность, хронические инфекционно-воспалительные заболевания. Исследование проводилось в соответствии с принципами Хельсинкской декларации 2013 г. Протокол исследования был одобрен локальным этическим комитетом Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (протокол № 04-21 от 18.02.2021). Все участники исследования предоставили письменное информированное согласие на участие в исследовании.

Участники исследования проходили клинико-лабораторное обследование с оценкой следующих параметров: возраст, индекс массы тела (ИМТ), артериальное давление, биохимический анализ крови с определением гликемии, гликозилированного гемоглобина, липидного профиля крови (общий холестерин, липопротеины низкой плотности (ЛПНП)).

Исследование воспалительного статуса моноцитов

Воспалительный статус моноцитов оценивали по уровню секреции воспалительных цитокинов: фактор некроза опухоли- α (ФНО- α), интерлейкин- 1β (ИЛ- 1β) и моноцитарный хемотаксический протеин-1 (MCP-1), культивируемых моноцитами/макрофагами участников исследования. Для получения первичной культуры моноцитов цельную кровь участников исследования центрифугировали в градиенте фикола. Из полученной лейкоцитарной фракции изолировали CD14+ моноциты с использованием колонок для иммуномагнитной сепарации и парамагнитных наночастиц для выделения CD14+ клеток (“Miltenyi Biotec”, США). Выделенные моноциты сажали в две лунки 48-луночного планшета в количестве 500000 клеток на лунку и культивировали в 0,5 мл культуральной среды X-VIVO (“Lonza”, Германия) при 37°C. В лунке 1 оценивали базальную секрецию воспалительных цитокинов культивируемыми моноцитами. Образцы культуральной жидкости получали через 24 ч после посадки моноцитов для оценки нестимулированной секреции воспалительных цитокинов. В лунке 2 оценивали иммунный ответ культивируемых моноцитов/макрофагов на воспалительную стимуляцию липополисахаридом (ЛПС). С этой целью в культуру моноцитов добавляли ЛПС в концентрации 1 мг/мл в 1-е сут культивирования и оценивали секрецию изучаемых цитокинов после 24 ч инкубации для характеристики стимулированной секреции. Далее производили смену среды и инкубировали клетки в течение 5 сут без воспалительной стимуляции. На 6-е сут в лунку 2 повторно добавляли ЛПС в концентрации 1 мг/мл и инкубировали 24 ч, после чего получали образцы культуральной жидкости для оценки иммунного ответа культивируемых клеток на повторную воспалитель-

ную стимуляцию, т.е. для характеристики толерантности иммунного ответа. В полученных образцах культуральной жидкости определяли уровень воспалительных цитокинов ФНО- α , ИЛ- 1β и MCP-1 методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческих наборов Human TNF-alpha/TNFSF1A, IL-1beta/IL-1F2 и CCL2/MCP-1 DuoSet ELISA (“R&D Systems”, США).

Статистический анализ

Статистический анализ данных проводился с использованием программы SPSS 27.0 (“SPSS”, США). Для оценки различий между группами был использован U-критерий Манна — Уитни. Данные представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения, Mean (SD). Корреляционный анализ с использованием коэффициента Пирсона проводился для оценки взаимосвязи секреции цитокинов культивируемыми моноцитами с клинико-лабораторными характеристиками участников исследования.

Результаты и их обсуждение

Всего с настоящее исследование были включены 80 участников в возрасте от 50 до 70 лет — 40 пациентов с впервые выявленным СД 2 типа и 40 участников контрольной группы без СД. В табл. 1 представлена сравнительная характеристика клинико-лабораторных показателей участников исследования с СД 2 типа и условно здоровых участников контрольной группы.

Участники контрольной группы не отличались достоверно от пациентов с СД 2 типа по полу и возрасту, а также не имели значимых отличий по уровню общего холестерина в сыворотке крови. Пациенты с СД 2 типа имели достоверно более высокий ИМТ, при этом 7% участников исследования с СД 2 типа имели нормальный вес, 27% имели избыточный вес, по 33% имели ожирение 1 и 2 степени. В контрольной группе 35% участников имели нормальный

Таблица 1. Клинико-лабораторная характеристика участников исследования
Table 1. Clinical and laboratory characteristics of study participants

Характеристики	Контрольная группа	Группа СД 2 типа	Достоверность отличий, р
Возраст, лет	61 (5)	63 (6)	0,088
Пол, м/ж	12/28	14/26	0,263
ИМТ, кг/м ²	26,5 (3,8)	31,7 (6,3)	<0,001
Глюкоза, ммоль/л	4,9 (0,4)	7,8 (1,1)	<0,001
HbA1c, %	5,8 (0,3)	6,7 (0,7)	<0,001
Артериальная гипертония, %	38%	69%	<0,001
Общий холестерин, ммоль/л	5,7 (0,7)	5,4 (1,4)	0,126
ЛПНП, ммоль/л	2,1 (1,3)	3,4 (1,0)	<0,001

Примечание: ИМТ — индекс массы тела; ЛПНП — липопротеины низкой плотности; HbA1c — гликозилированный гемоглобин.

Note: ИМТ — body mass index; ЛПНП — low density lipoprotein; HbA1c — glycated hemoglobin.

ИМТ, 45% имели избыточный вес и 20% имели ожирение 1 степени. Участники исследования с СД 2 типа также имели достоверно более высокие показатели гликемии и гликозилированного гемоглобина, сывороточный уровень ЛПНП.

Воспалительный статус моноцитов/макрофагов оценивали по уровню секреции воспалительных цитокинов в первичной культуре моноцитов/макрофагов участников исследования. В табл. 2 представлены результаты оценки секреции воспалительных цитокинов культивируемыми моноцитами/макрофагами участников исследования.

В результате исследования показано, что в культуре моноцитов пациентов с СД 2 типа были достоверно более высокие уровни базальной, ЛПС-стимулированной, а также повторно стимулированной секреции ФНО- α , чем в контрольной группе. При этом уровень повторно стимулированной секреции в обеих группах был значительно ниже, чем уровень секреции после первой стимуляции, что демонстрирует наличие толерантности иммунного ответа макрофагов в отношении секреции ФНО- α , поскольку толерантность иммунного ответа принято рассматривать как сниженный

Таблица 2. Секреция воспалительных цитокинов культивируемыми моноцитами/макрофагами участников исследования

Table 2. Secretion of inflammatory cytokines by cultured monocytes/macrophages of study participants

Секреция цитокинов, пг/мл		Контрольная группа	Группа СД 2 типа	Достоверность отличий, р
ФНО- α	Базальная	134 (150)	323 (202)	<0,001
	Стимулированная	2974 (1487)	5706 (3546)	<0,001
	Повторная стимуляция	114 (46)	167 (54)	<0,001
ИЛ-1 β	Базальная	103 (77)	111 (52)	0,608
	Стимулированная	1035 (1047)	1198 (586)	0,413
	Повторная стимуляция	97 (35)	88 (56)	0,470
MCP-1	Базальная	2476 (1593)	5401 (2843)	<0,001
	Стимулированная	18389 (4618)	20542 (8185)	0,201
	Повторная стимуляция	3924 (2965)	14845 (9923)	<0,001

Примечание: ИЛ-1 β — интерлейкин-1 β ; ФНО- α — фактор некроза опухоли- α ; MCP-1 — моноцитарный хемотаксический протеин-1.

Note: ИЛ-1 β — Interleukin-1 β ; ФНО- α — tumor necrosis factor- α ; MCP-1 — monocyte chemotactic protein-1.

ответ на вторую стимуляцию после возвращения клеток в неактивированное состояние [13]. Вторичный ответ на последующий неспецифический стимул может быть изменен таким образом, что клетки реагируют более выраженно, чем на первичную стимуляцию, вызывая гиперсекрецию медиаторов воспаления, превышающую уровень секреции при первичной стимуляции, что представляет собой нарушение толерантности иммунного ответа [1].

Базальная, ЛПС-стимулированная и повторно стимулированная секреция ИЛ-1 β культивируемыми моноцитами/макрофагами пациентов с СД 2 типа не отличалась достоверно от моноцитов участников контрольной группы. Кроме того, повторная секреция ИЛ-1 β также была значительно ниже ответа на первичную стимуляцию, что демонстрирует толерантность иммунного ответа макрофагов в отношении ИЛ-1 β . Результаты другого исследования демонстрируют отсутствие достоверных отличий уровней базальной и ЛПС-стимулированной ИЛ-1 β секреции культивируемыми моноцитами пациентов с СД 2 типа по сравнению с контрольной группой [2]. Тем не менее данные многочисленных исследований демонстрируют участие ИЛ-1 β в развитии СД 2 типа [3]. Известно, что ИЛ-1 β является одним из главных цитокинов, секретируемых тканевыми макрофагами жировой ткани и вовлеченных в развитие инсулинорезистентности и СД 2 типа при ожирении [7].

Базальная секреция хемокина МСР-1 культивируемыми моноцитами/макрофагами была достоверно увеличена в группе СД 2 типа по сравнению с контрольной группой, ЛПС-стимулированная секреция МСР-1 не отличалась достоверно между группами. Повторно стимулированная секреция МСР-1 была значительно выше в группе СД по сравнению с контрольной группой, при этом у 42% участников исследования с СД2 типа уровень повторной

стимулированной секреции после периода отдыха, следующего за первой стимуляцией ЛПС, был выше, чем ответ на первичную стимуляцию, что демонстрирует нарушение толерантности иммунного ответа в отношении секреции МСР-1 [1]. В то же время в контрольной группе у всех пациентов повторно стимулированная секреция была значительно ниже ответа на первую стимуляцию, т.е. не выявлено ни одного пациента с нарушением толерантности иммунного ответа. В настоящее время толерантность иммунного ответа клеток врожденного иммунитета в патогенезе СД 2 типа широко изучается на различных клеточных и животных моделях, а также в клинических исследованиях [11], однако нарушение толерантности иммунного ответа макрофагов в отношении МСР-1 показано впервые. МСР-1 считается ключевым хемокином, обуславливающим инфильтрацию жировой ткани макрофагами и принимающим непосредственное участие в развитии инсулинорезистентности [14, 20]. Кроме того, МСР-1 используется как биомаркер осложнений СД 2 типа [18, 21].

Для оценки взаимосвязи секреции воспалительных цитокинов с клинико-лабораторными характеристиками участников исследования был проведен корреляционный анализ. Обнаружена взаимосвязь базальной и ЛПС-стимулированной секреции ФНО- α с ИМТ: $r=0,631$, $p<0,001$ и $r=0,582$, $p<0,001$ соответственно. Кроме того, уровень базальной и стимулированной секреции ФНО- α коррелировал с уровнем гликемии, $r=0,427$, $p=0,012$ и $r=0,372$, $p=0,037$ соответственно. Рисунок демонстрирует корреляцию базальной секреции ФНО- α с ИМТ участников исследования в группе СД 2 типа, которая являлась наиболее достоверной по результатам корреляционного анализа.

ФНО- α считается одним из основных факторов, индуцирующих развитие резистентности к инсулину в жировой ткани наряду с другими воспалительными ци-

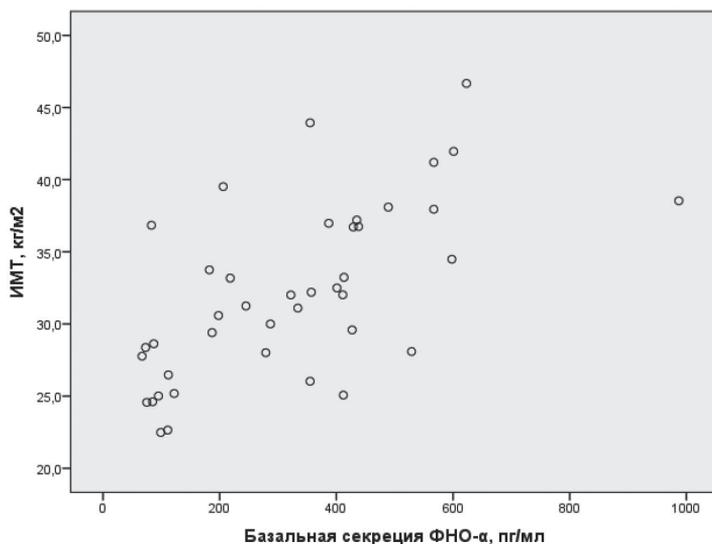


Рис. Взаимосвязь базальной секреции ФНО- α и ИМТ у пациентов с СД 2 типа.

Fig. The relationship between basal secretion TNF- α and BMI in patients with type 2 diabetes.

токинами, в частности МСР-1 и ИЛ-1 β [4]. ФНО- α играет ключевую роль на всех этапах хронического воспаления при СД 2 типа — от формирования инсулинорезистентности до развития осложнений СД, в т.ч. в прогрессировании атеросклероза и развитии сердечно-сосудистых заболеваний [8]. Результаты корреляционного анализа, демонстрирующие взаимосвязь ИМТ и гликемии с повышенной секрецией ФНО- α культивируемыми макрофагами пациентов в СД 2 типа, соответствуют результатам более ранних исследований [15] и углубляют современные представления о роли ФНО- α в патогенезе СД 2 типа.

Выводы

Результаты исследования демонстрируют воспалительную активацию моноцитов с гиперсекрецией ФНО- α и МСР-1 у пациентов с СД 2 типа, а также нарушение толерантности иммунного ответа макрофагов при СД в отношении секреции

МСР-1. Кроме того, выявлена взаимосвязь секреции ФНО- α с ИМТ и уровнем гликемии. Таким образом, результаты исследования свидетельствуют о важной роли ФНО- α и МСР-1 в патогенезе хронического воспаления при СД 2 типа. Однако из трех исследованных в данном проекте цитокинов нарушение толерантности иммунного ответа макрофагов выявлено только в отношении МСР-1, в связи с этим необходимы дальнейшие исследования воспалительного статуса моноцитов/макрофагов при СД 2 типа для оценки секреции других воспалительных цитокинов, а также изучения механизмов и выявления факторов, ассоциированных с воспалительной активацией и нарушением иммунной толерантности моноцитов/макрофагов. В то же время результаты настоящего исследования позволяют рассматривать ФНО- α и МСР-1 в качестве потенциальных терапевтических мишеней для разработки средств патогенетической терапии СД 2 типа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Al B., Suen T.K., Placek K., Netea M.G. Innate (learned) memory. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2023;152(3):551–566. DOI: 10.1016/j.jaci.2023.06.014.
2. Alvarado-Vázquez P.A., Grosick R.L., Moracho-Vilriales C., Ward E., Threatt T., Romero-Sandoval E.A. Cytokine production capabilities of human primary monocyte-derived macrophages from patients with diabetes mellitus type 2 with and without diabetic peripheral neuropathy. *J. Pain Res.* 2018;12:69–81. DOI: 10.2147/JPR.S186372.
3. Chen X., Zhang D., Li Y., Wang W., Bei W., Guo J. *NLRP3* inflammasome and IL-1 β pathway in type 2 diabetes and atherosclerosis: Friend or foe? *Pharmacol. Res.* 2021;173:105885. DOI: 10.1016/j.phrs.2021.105885.
4. de Baat A., Trinh B., Ellingsgaard H., Donath M.Y. Physiological role of cytokines in the regulation of mammalian metabolism. *Trends Immunol.* 2023;44(8):613–627. DOI: 10.1016/j.it.2023.06.002.
5. Fujisaka S. The role of adipose tissue M1/M2 macrophages in type 2 diabetes mellitus. *Diabetol. Int.* 2020;12(1):74–79. DOI: 10.1007/s13340-020-00482-2.
6. Garg R., Kumariya S., Katekar R., Verma S., Goand U.K., Gayen J.R. JNK signaling pathway in metabolic disorders: An emerging therapeutic target. *Eur. J. Pharmacol.* 2021;901:174079. DOI: 10.1016/j.ejphar.2021.174079.
7. Ghanbari M., Momen Maragheh S., Aghazadeh A., Mehrjuyan S.R., Hussien B.M., Abdoli Shadbad M., et al. Interleukin-1 in obesity-related low-grade inflammation: From molecular mechanisms to therapeutic strategies. *Int. Immunopharmacol.* 2021;96:107765. DOI: 10.1016/j.intimp.2021.107765.
8. Henning R.J. Obesity and obesity-induced inflammatory disease contribute to atherosclerosis: a review of the pathophysiology and treatment of obesity. *Am. J. Cardiovasc. Dis.* 2021;11(4):504–529.
9. <https://diabetesatlas.org>
10. Mukherjee S., Skrede S., Haugstoyl M., López M., Fernø J. Peripheral and central macrophages in obesity. *Front Endocrinol. (Lausanne).* 2023;14:1232171. DOI: 10.3389/fendo.2023.1232171.
11. Naruse K. Trained immunity: A key player of "metabolic memory" in diabetes. *J. Diabetes Investig.* 2022;13(4):608–610. DOI: 10.1111/jdi.13734.
12. Nedosugova L.V., Markina Y.V., Bochkareva L.A., Kuzina I.A., Petunina N.A., Yudina I.Y., Kirichenko T.V. Inflammatory Mechanisms of Diabetes and Its Vascular Complications. *Biomedicines.* 2022;10(5):1168. DOI:10.3390/biomedicines10051168.
13. Netea M.G., Domínguez-Andrés J., Barreiro L.B., Chavakis T., Divangahi M., et al. Defining trained immunity and its role in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 2020;20(6):375–388. DOI: 10.1038/s41577-020-0285-6.
14. Ota T. Chemokine systems link obesity to insulin resistance. *Diabetes Metab. J.* 2013;37(3):165–172. DOI: 10.4093/dmj.2013.37.3.165.
15. Ray I., Mahata S.K., De R.K. Obesity: An Immunometabolic Perspective. *Front Endocrinol. (Lausanne).* 2016;7:157. DOI: 10.3389/fendo.2016.00157.
16. Rehman A., Pacher P., Haskó G. Role of Macrophages in the Endocrine System. *Trends Endocrinol. Metab.* 2021;32(4):238–256. DOI: 10.1016/j.tem.2020.12.001.
17. Robinson K.A., Akbar N., Baidzajevs K., Choudhury R.P. Trained immunity in diabetes and hyperlipidemia: Emerging opportunities to target cardiovascular complications and design new therapies. *FASEB J.* 2023;37(11):e23231. DOI: 10.1096/fj.202301078R.
18. Sauriasari R., Safitri D.D., Azmi N.U. Current updates on protein as biomarkers for diabetic kidney disease: a systematic review. *Ther. Adv. Endocrinol. Metab.* 2021;12:20420188211049612. DOI: 10.1177/20420188211049612.
19. Włodarczyk M., Druszczyńska M., Fol M. Trained Innate Immunity Not Always Amicable. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(10):2565. DOI: 10.3390/ijms20102565.
20. Xu L., Kitade H., Ni Y., Ota T. Roles of Chemokines and Chemokine Receptors in Obesity-Associated Insulin Resistance and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Biomolecules.* 2015;5(3):1563–1579. DOI: 10.3390/biom5031563.
21. Zhao J., Zhang L.X., Wang Y.T., Li Y., Chen Md H.L. Genetic Polymorphisms and the Risk of Diabetic Foot: A Systematic Review and Meta-Analyses. *Int. J. Low Extrem. Wounds.* 2022;21(4):574–587. DOI: 10.1177/1534734620977599.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Кириченко Татьяна Владимировна, к.м.н., Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского»;
e-mail: t-gorchakova@mail.ru

Tatiana V. Kirichenko, Cand. Sci. (Med.), A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology of B.V. Petrovsky National Research Centre of Surgery;
e-mail: t-gorchakova@mail.ru

Бочкарева Лейла Азимовна, ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет);
e-mail: lejla-ni@mail.ru

Leyla A. Bochkareva, Sechenov Moscow State Medical University (Sechenov University);
e-mail: lejla-ni@mail.ru

Недосугова Людмила Викторовна, д.м.н., проф., ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет);
e-mail: profmila@mail.com

Lyudmila V. Nedosugova, Dr. Sci. (Med.), Prof., Sechenov Moscow State Medical University (Sechenov University);
e-mail: profmila@mail.com

Маркина Юлия Владимировна*, к.м.н., Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского»;
e-mail: yu.v.markina@gmail.com

Yuliya V. Markina*, Cand. Sci. (Med.), A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology of B.V. Petrovsky National Research Centre of Surgery;
e-mail: yu.v.markina@gmail.com

Кузина Ирина Александровна, к.м.н., ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет);
e-mail: kuzina_i_a@staff.sechenov.ru

Irina A. Kuzina, Cand. Sci. (Med.), Sechenov Moscow State Medical University (Sechenov University);
e-mail: kuzina_i_a@staff.sechenov.ru

Петунина Нина Александровна, чл.-корр. РАН, д.м.н., ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет);
e-mail: napetunina@mail.ru

Nina A. Petunina, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Med.), Sechenov Moscow State Medical University (Sechenov University);
e-mail: napetunina@mail.ru

Толстик Таисия Владимировна, Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского»;
e-mail: taya0077@mail.ru

Taisiya V. Tolstik, A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology of B.V. Petrovsky National Research Centre of Surgery;
e-mail: taya0077@mail.ru

Богатырева Анастасия Ильинична, Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского»;
e-mail: nastya.bogatyreva.96@mail.ru

Anastasia I. Bogatyreva, A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology of B.V. Petrovsky National Research Centre of Surgery;
e-mail: nastya.bogatyreva.96@mail.ru

Антонов Валерий Алексеевич, д.м.н., ФГУП
«Научно-исследовательский институт гигиены,
токсикологии и профпатологии» ФМБА России;
e-mail: antonov@rihtop.ru

Valeriy A. Antonov, Dr. Sci. (Med.), Research
Institute of Hygiene, Toxicology and Occupational
Pathology of the Federal Medical and Biological
Agency of Russia;
e-mail: antonov@rihtop.ru

Маркин Александр Михайлович, к.м.н.,
Научно-исследовательский институт морфологии
человека имени академика А.П. Авцына
ФГБНУ «Российский научный центр хирургии
имени академика Б.В. Петровского»;
e-mail: alexander.markin.34@gmail.com

Alexander M. Markin, Cand. Sci. (Med.),
A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology
of B.V. Petrovsky National Research Centre
of Surgery;
e-mail: alexander.markin.34@gmail.com

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

МОДУЛИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ КРАЙНЕ ВЫСОКОЙ ЧАСТОТЫ НА ТКАНЕВОЙ ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ И МИКРОГЕМОДИНАМИКУ В КОЖЕ

М.Ю. Раваева^{1,*}, И.В. Черетаев¹, Е.Н. Чуян¹, П.А. Галенко-Ярошевский²

¹ ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского»
295007, Российская Федерация, Республика Крым, Симферополь, пр-т Академика Вернадского, 4

² ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России
350063, Российская Федерация, Краснодар, ул. им. Митрофана Седина, 4

В работе рассматриваются показатели микрогемодинамики и тканевого окислительного метаболизма и их взаимосвязь у крыс после 10-кратного воздействия низкоинтенсивным электромагнитным излучением крайне высокой частоты (ЭМИ КВЧ). Цель исследования — выявить особенности реакции микроциркуляции и тканевого окислительного метаболизма на 10-кратное действие электромагнитного излучения крайне высокой частоты. Эксперимент проводили на 40 половозрелых крысах-самцах Wistar массой 200–220 г, которые содержались в условиях вивария с естественным свето-темновым циклом. Животных разделили на 2 группы по 20 крыс в каждой. Животные, находившиеся в первой группе, являлись биологическим контролем и подвергались ложному воздействию ЭМИ КВЧ (плацебо), животные второй группы подвергались мм-воздействию в течение 10 сеансов ежедневно, в утреннее время. На 10-е сут КВЧ-воздействия проводилась регистрация показателей тканевой флуоресценции кожи основания хвоста. Показано, что при 10-кратном воздействии низкоинтенсивным ЭМИ КВЧ происходит увеличение концентрации и интенсивности флуоресценции никотинамидадениндинуклеотида (НАДН), повышение флавинадениндинуклеотида (ФАД) и редокс-отношения (РО), что свидетельствует о росте потребности клеток в аденозинтрифосфате и преобладании окислительного фосфорилирования над другими процессами, что в целом свидетельствует об активации дыхательной цепи. При этом в микроциркуляторном русле наблюдали увеличение эндотелий-зависимой вазодилатации, снижение периферического сопротивления, увеличение притока крови в нутритивное микрососудистое русло, улучшение веноулярного оттока. В целом можно заключить, что модулирующее действие ЭМИ КВЧ проявляется в перестройках корреляционных связей: на первый план выходит коэффициент вариации — итоговый расчетный показатель микроциркуляции, который имеет сильные отрицательные связи со всеми показателями тканевого метаболизма (ФАД, НАДН, РО), и амплитуды эндотелиальных ритмов, связанных с периодическим релизингом оксида азота эндотелием, имеющим сильную отрицательную связь с ФАД.

Ключевые слова: кожа, микрогемодинамика, тканевой окислительный метаболизм, низкоинтенсивное электромагнитное излучение крайне высокой частоты, никотинамидадениндинуклеотид, флавинадениндинуклеотид, редокс-отношение

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: работа выполнена в рамках проекта РФФ № 23-24-00332 «Тканевая микрогемодинамика: механизмы антистрессорного действия низкоинтенсивного миллиметрового излучения».

Для цитирования: Раваева М.Ю., Черетаев И.В., Чуян Е.Н., Галенко-Ярошевский П.А. Моделирующее действие низкоинтенсивного электромагнитного излучения крайне высокой частоты на тканевой окислительный метаболизм и микрогемодинамику в коже. *Биомедицина*. 2023;19(4):35–46.

<https://doi.org/10.33647/2074-5982-19-4-35-46>

Поступила 15.08.2023

Принята после доработки 07.10.2023

Опубликована 10.12.2023

MODULATING EFFECT OF EXTREMELY HIGH-FREQUENCY LOW-INTENSITY ELECTROMAGNETIC RADIATION ON TISSUE OXIDATIVE METABOLISM AND SKIN MICROHEMODYNAMICS

Marina Yu. Ravaeva^{1,*}, Igor V. Cheretaev¹, Elena N. Chuyan¹,
Pavel A. Galenko-Yaroshevskii²

¹ V.I. Vernadsky Crimean Federal University
295007, Russian Federation, Republic of Crimea, Simferopol, Academician Vernadsky Ave., 4

² Kuban State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia
350063, Russian Federation, Krasnodar Region, Krasnodar, Mitrofana Sedina Str., 4

We set out to examine the indicators of microhemodynamics and tissue oxidative metabolism in rats after their tenfold exposure to extremely high-frequency low-intensity electromagnetic radiation (EHF EMR). The aim was to elucidate the specifics of skin microcirculation and tissue oxidative metabolism following exposure to tenfold electromagnetic radiation of extremely high frequency. The experiment was carried out on 40 mature male Wistar rats weighing 200–220 g, which were kept in standard vivarium conditions under natural light regimen. The animals were divided into two groups with 20 rats each. The animals in the first group were biological controls and were exposed to false EHF EMR (placebo); the animals in the second group were exposed to mm-exposure in the morning, 10 sessions daily. On the 10th day of EMR exposure, the indicators of skin tissue fluorescence on the tail base were recorded. Tenfold exposure to low-intensity EHF EMR was shown to increase the concentration and intensity of NADH fluorescence, as well as the FAD and redox ratio. This indicates an increased cellular demand for ATP and the predominance of oxidative phosphorylation over other processes, thus demonstrating the activation of the respiratory chain. At the same time, an increase in endothelium-dependent vasodilation, a decrease in peripheral resistance, an increase in blood flow to the nutritive microvascular bed, and an improvement in venular outflow were observed in the microcirculatory bed. The conclusion is made that the modulating effect of EHF EMR is manifested in the rearrangements of correlations. Thus, the coefficient of variation comes to the fore – the final calculated indicator of microcirculation, which has strong negative associations with all indicators of tissue metabolism (FAD, NADH, RR). In addition, the amplitudes of endothelial rhythms associated with periodic releasing of nitric oxide by the endothelium show a strong negative association with FAD.

Keywords: skin, microhemodynamics, tissue oxidative metabolism, extremely high-frequency low-intensity electromagnetic radiation, nicotinamide adenine dinucleotide, flavin adenine dinucleotide, redox potential

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

Funding: the work was carried out within the framework of the RSF project No. 23-24-00332 “Tissue microhemodynamics: mechanisms of the anti-stress action of low-intensity millimeter radiation”.

For citation: Ravaeva M. Yu., Cheretaev I. V., Chuyan E. N., Galenko-Yaroshevskii P. A. Modulating Effect of Extremely High-Frequency Low-Intensity Electromagnetic Radiation on Tissue Oxidative Metabolism and Skin Microhemodynamics. *Journal Biomed.* 2023;19(4):35–46. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-19-4-35-46>

Submitted 15.08.2023

Revised 07.10.2023

Published 10.12.2023

Введение

Микроциркуляция является не только структурно-функциональной единицей системы крово- и лимфотока, обеспечивающей обмен между тканями, но и важнейшим источником информации о состоянии организма в целом, что позволяет использовать параметры микроциркуляции в качестве прогностических и диагностических критериев в оценке общего функционального состояния организма как в интактных условиях, так и при действии различных факторов, в т.ч. и физических.

Одним из таких физических факторов является низкоинтенсивное электромагнитное излучение крайне высокой частоты (ЭМИ КВЧ). Экспериментальными исследованиями, проводимыми нашим научным коллективом уже более 40 лет, доказано, что низкоинтенсивное ЭМИ КВЧ с длиной волны 7,1 мм и плотностью потока мощности 0,1 мВт/см² при его изолированном, превентивном и комбинированном со стресс-факторами различной природы действии обладает выраженным биологическим эффектом [15, 16]. Результаты проведенных на лабораторных животных (крысах) исследований дали основания полагать, что как к изолированному, так и к превентивному и комбинированному со стресс-факторами разной природы (ограничение подвижности, инфицирование, болевое воздействие) действию низкоинтенсивного ЭМИ КВЧ развиваются адаптационные реакции различного типа.

Полагаем, что биологические и терапевтические эффекты ЭМИ КВЧ развивались в результате изменения микроциркуляции и, как следствие, изменения тканевого окислительного метаболизма. Наиболее значимой частью механизма тканевого энергетического обмена являются восстановленные пиридиннуклеотиды — никотинамидадениндинуклеотид (НАДН) и никотинамидадениндинуклеотидфосфат водорода (НАДФН), а также окисленные

флавопротеиды (флавинадениндинуклеотид — ФАД). На данный момент остаётся актуальной проблема взаимосвязи коферментов НАДН и ФАД с микроциркуляторным руслом, однако очевидно, что по данным показателям возможно делать выводы о состоянии клеточного и тканевого метаболизма [9, 11]. Применение методического подхода, основанного на одновременной оценке активности тканевых коферментов: восстановленного НАДН и окисленного ФАД способом флуоресцентной спектроскопии [17, 18] и показателей микроциркуляции кровотока в коже крыс, подвергшихся превентивному 10-кратному КВЧ-воздействию, — позволит ответить на этот вопрос.

Цель исследования — выявить особенности реакции микроциркуляции и тканевого окислительного метаболизма на 10-кратное действие электромагнитного излучения крайне высокой частоты.

Материалы и методы

Экспериментальная часть работы выполнена на кафедре физиологии человека и животных и биофизики Института биохимических технологий, экологии и фармации в Центре коллективного пользования научным оборудованием «Экспериментальная физиология и биофизика».

Экспериментальные животные

Эксперименты проводили на 40 половозрелых крысах-самцах Wistar массой 200–220 г («ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово», Ленинградская обл.), прошедших карантин не менее 14 дней. Животные содержались в условиях вивария с естественным свето-темновым циклом при температуре 18–22°C на подстилке на основе початков кукурузы (ООО «Зилубаг», Россия) со свободным доступом к воде и полноценному гранулированному корму ЛБК-120 (ЗАО «Госненский комбикормовый завод», Россия). Исследование

было выполнено в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» и ГОСТ Р 53434-2009 от 02.12.2009, правилами лабораторной практики при проведении доклинических исследований и одобрено решением Этического комитета ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского».

Дизайн исследований

Для эксперимента были отобраны животные одинакового возраста, характеризующиеся средней двигательной активностью и низкой эмоциональностью в тесте «Открытое поле», которые составляют большинство в популяции. Такой отбор позволил сформировать однородные группы животных с близкими конституционными особенностями, односторонне реагирующими на действие того или иного фактора [14]. Для проведения отбора использовали 70 половозрелых крыс-самцов Wistar массой 180–200 г («ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово», Ленинградская обл.), прошедших карантин не менее 14 дней. При процедуре отбора животных в «Открытом поле» их поведение подвергали тестированию в течение 5 мин в инфракрасном мониторе активности IR Actimeter («PanLab Harvard Apparatus», Испания) с программным обеспечением Actitrack 2.7.13 («PanLab Harvard Apparatus», Испания), используя показатели общей пройденной дистанции, локомоторной активности, средней скорости перемещений, временных интервалов, проведенных в состоянии полного покоя (фризинг) и в состоянии медленных и быстрых движений, груминга и числа болюсов. Таким образом было отобрано 40 животных. Через 2 недели после отбора животных выполняли эксперимент по оценке действия 10-кратного электромагнитного излучения крайне высокой частоты на показатели микроциркуляции и тканевого окислительного метаболизма.

За 1 сут до проведения эксперимента отобранных животных рандомизировали

методом модифицированной блочной рандомизации. В одном блоке рандомизации использовали 10 индивидуальных клеток, в которые в случайном порядке рассаживали самцов крыс и присваивали им номера. Таким образом, для формирования двух групп по 20 крыс необходимо было выполнить 4 процедуры заполнения этих клеток. В программе Microsoft Office Excel 2019 с помощью генератора случайных чисел формировали 4 столбца с номерами клеток, соответствующие данным процедурам. Затем делили полученную таблицу на строки. Одной группе из 20 животных соответствовало 5 строк из таблицы с номерами индивидуальных клеток, полученных в ходе 4 заполнений с помощью генератора случайных чисел.

Таким образом было сформировано две группы по 20 особей в каждой. Животные первой группы являлись биологическим контролем и подвергались ложному воздействию ЭМИ КВЧ (контроль). При этом соблюдались все условия для облечения животных, но прибор не был подключен к электросети.

Крыс второй группы подвергали действию ЭМИ КВЧ. КВЧ-воздействие на животных проводили 10-кратно, в течение 30 мин ежедневно, в утреннее время, путем наложения на шейно-воротниковую область волновода аппарата КВЧ-терапии «КВЧ-НД» (рабочая длина волны 7,1 мм, плотность потока мощности облучения 4–12 мВт/см²; ООО «Научно-коммерческая фирма РЭСЛА», Россия; Декларация соответствия № РОСС Ру. ME67.D00227; Рег. удостов. № ФСР 2007/00763 от 18.09.2007).

На 10-е сут спустя 60 мин после 10-го сеанса истинного/ложного КВЧ-воздействия у крыс обеих групп проводилась регистрация показателей микроциркуляции и тканевой флуоресценции диагностическим комплексом «ЛАЗМА-МЦ» (ООО НПП «ЛАЗМА», Россия). Поскольку данный метод является высокочувствительным,

то для сведения к минимуму внешних помех животные на время регистрации показателей помещались в прозрачные пеналы из оргстекла, ограничивающие их подвижность. Размеры пеналов подбирали так, чтобы животные могли свободно дышать и ни одна часть их тела не была плотно зажата. Хвост крысы фиксировали на одной линии с телом в горизонтальном положении тканевым пластырем. Оптоволоконный зонд прибора «ЛАЗМА-МЦ» также фиксировали тканевым пластырем перпендикулярно у основания хвоста. Показатели прибора записывали в тот момент, когда животное находилось в спокойном состоянии. Особенности проведения ЛДФ-метрии у крыс описаны в наших предыдущих исследованиях [15, 16].

При изучении микроциркуляции регистрировали следующие показатели: показатель микроциркуляции (ПМ) — формируется в полученном сигнале как составляющая, которая обуславливается отражением от движущихся эритроцитов относительно стационарной стенки капилляра, пропорциональная скорости движения (эффект Допплера); показатель СКО, σ («флакс») — среднее квадратичное отклонение амплитуды колебаний кровотока, характеризует величину временной изменчивости микроциркуляции; коэффициент вариации K_v , который определяется соотношением между перфузией крови и ее флаксом [2–8].

С помощью вейвлет-анализа ЛДФ-сигнала определяли амплитуды колебаний кровотока разных частотных диапазонов. Наиболее низкая частота (0,0095–0,02 Гц) характерна для эндотелиальных колебаний, обусловленных периодическими сокращениями цитоскелета эндотелиоцитов. Эндотелиальные колебания отражают воздействие гуморально-метаболических факторов на микрососудистое русло и характеризуют состояние нутритивного кровотока [5]. Колебания в частотах

0,07–0,15 Гц, или миогенные колебания, обусловлены периодической активностью гладкомышечных клеток артериол, приводящей к изменению диаметра их просвета (вазомоции) [1]. На такую периодичность констрикции и дилатации микрососудов накладываются нейрогенные колебания (0,02–0,046 Гц), отражающие симпатическую регуляторную активность [19]. К высокочастотным колебаниям относятся дыхательные (0,15–0,4 Гц) и пульсовые (0,8–0,16 Гц). Дыхательные волны представлены периодическими изменениями давления в венозном отделе сосудистого русла, вызываемыми дыхательными экскурсиями грудной клетки. Пульсовые колебания кровотока обусловлены перепадами внутрисосудистого давления, которые в большей или меньшей степени синхронизированы с кардиоритмом [3].

При изучении тканевого метаболизма на доплеровском канале «ЛАЗМА-МЦ» (канал ЛАЗМА-МЦ-III) использовали лазерный модуль с длиной волны излучения 1064 нм. Для стимуляции флуоресценции НАДН применяют излучение при длине волны 365 нм, спектр флуоресценции НАДН — около 460–470 нм. Для возбуждения ФАД применяют излучение при длине волны 450 нм, а спектр флуоресценции ФАД — в пределах 510–520 нм.

Для оценки внутриклеточных энергетических обменных процессов методом флуоресцентной спектроскопии оценивали следующие показатели [4, 13]:

- индекс тканевого содержания для восстановленного НАДН;
- индекс тканевого содержания для окисленной формы ФАД;
- редокс-отношение (РО) амплитуд флуоресценции НАДН и ФАД.

Статистическую обработку результатов исследований проводили с использованием пакета Statistica 8.0. Поскольку распределение экспериментальных значений в группах отличалось от нормального, то оценку

достоверности межгрупповых различий осуществляли с помощью *U*-теста Манна — Уитни. Связь показателей микроциркуляции и тканевого метаболизма у крыс проводили с использованием рангового коэффициента корреляции Спирмена, корреляции являлись значимыми при $p < 0,05$, и кластерного анализа (Complete linkage).

Результаты и их обсуждение

Результаты настоящего исследования показали, что у крыс, подвергшихся 10-кратному КВЧ-воздействию, отмечено повышение значений нормированных амплитуд флуоресценции НАДН и ФАД на 82,5% ($p \leq 0,05$) и 42,6% ($p \leq 0,05$) соответственно в сравнении со значениями данных показателей животных, находящихся в состоянии физиологической нормы (табл. 1, рис. 1).

Увеличение нормированных величин флуоресценции НАДН и ФАД свидетельствует об активизации окислительного фосфорилирования, стимулирующего аэробный метаболизм у крыс. Следует заметить, что регистрируемые колебания концентраций НАДН и ФАД могут быть сложными, динамика этих колебаний может быть нелинейной в течение всего жизненного цикла клеток. Так, оценивая функциональное состояние митохондрий и активность процессов окисления и восстановления

в клетках, важной является не столько концентрация данных коферментов, сколько их соотношение, что отображает кислородный метаболизм. По величине РО можно судить о способности ферментов отдавать и присоединять электроны, а также о скорости протекания окислительно-восстановительных реакций. После 10-кратного КВЧ-воздействия РО увеличился на 36,9% ($p \leq 0,05$) относительно контрольной группы. Повышение РО у крыс также свидетельствует об увеличении окислительного фосфорилирования в тканях.

Повышение концентрации и интенсивности флуоресценции НАДН и ФАД свидетельствует о росте потребности клеток в АТФ и преобладании окислительного фосфорилирования над другими процессами [9]. Для клеток в физиологических условиях с оптимальным количеством питательных веществ и кислорода повышение потребности в АТФ влечет за собой рост редокс-отношения. Это связано с потерей НАДН иона водорода и окислением его до НАД⁺ в процессе окислительного фосфорилирования. При гипоксии в условиях недостатка кислорода, который является главным конечным акцептором электронов в дыхательной цепи митохондрий, протекание реакций окислительного фосфорилирования становится практически

Таблица 1. Показатели спектроскопической флуоресценции тканей у крыс, подвергшихся 10-кратному КВЧ-воздействию

Table 1. Indicators of tissues spectroscopic fluorescence in rats exposed to 10-fold EHF exposure

Показатели	Группы	
	Контрольная (n=20)	КВЧ-воздействие (n=20)
НАДН	2,47±0,23	3,21±0,13 p=0,0387
ФАД	3,06±0,28	4,54±0,14 p=0,0421
РО	0,81±0,08	1,08±0,06 p=0,0490

Примечание: *p* — уровень достоверности различий по критерию Манна — Уитни; РО — редокс отношение (окислительно-восстановительный потенциал), ФАД — флавинадениндуклеотид фосфат, НАДН — никотинадениндениндуклеотид фосфат.

Note: *p* — the level statistically significant compared to according to the Mann-Whitney criterion; РО — redox ratio (redox potential), ФАД — flavin adenine dinucleotide phosphate, НАДН — nicotinamide adenine dinucleotide phosphate.

не осуществимым, при этом наблюдается увеличение концентрации НАДН [10]. Чтобы обеспечить энергетическую потребность в АТФ, клетка меняет тип обмена веществ на анаэробный гликолиз, в результате которого НАД⁺ присоединяет ион водорода и восстанавливается до НАДН с конечным образованием пирувата и АТФ. Отсутствие окисления НАДН через электронно-транспортную цепь и повышение концентрации НАДН в процессе гликолиза приводят к повышению интенсивности флюоресценции НАДН в клетке. Повышение РО в данном случае может свидетельствовать об активации дыхательной цепи [12] при 10-кратном воздействии ЭМИ КВЧ.

Следовательно, при 10-кратном воздействии низкоинтенсивным ЭМИ КВЧ происходит активация дыхательной цепи. Можно предположить, что данные перестройки в окислительном метаболизме определяются в первую очередь процессом адаптации микроциркуляторного кровотока к потребностям тканей в питательных веществах и удалению метаболитов. Поэтому следующим этапом было исследование реакции микроциркуляции к 10-кратному воздействию ЭМИ КВЧ.

В ходе проведенного исследования определено, что у крыс контрольной группы при введении физ. р-ра достоверных изменений показателей тканевой микрогемодинамики не происходило. В то же время после 10-кратного КВЧ-воздействия заре-

гистрированы изменения как осцилляторных, так и неосцилляторных показателей микрогемодинамики по сравнению с этими параметрами, полученными в контрольной группе животных (табл. 2).

Так, после 10-кратного КВЧ-воздействия наблюдалось достоверное увеличение амплитуд колебаний эндотелиального (Аэ, на 66,6%; $p \leq 0,05$), нейрогенного (Ан, на 52,9%; $p \leq 0,05$), миогенного (Ам, на 48,2%; $p \leq 0,05$) и пульсового (Ас, на 27,4%; $p \leq 0,05$) ритмов по сравнению с таковыми в контрольной группе животных (табл. 2).

Повышение Аэ отражает увеличение метаболической активности эндотелия и повышение базального уровня секреции оксида азота (NO) [7], повышение Ан свидетельствует о снижении импульсации симпатических вазомоторных волокон, приводя к снижению нейрогенного компонента артериолярного тонуса и, как следствие, к снижению жесткости сосудистой стенки [7]. Увеличение Ам свидетельствует о снижении тонуса прекапилляров, что приводит к увеличению количества функционирующих капилляров, увеличению диаметра сосудов, вследствие чего увеличивается поступление артериальной крови в nutritивное русло [8]. Увеличение Ас отражает увеличение объема притока артериальной крови в микроциркуляторное русло со стороны магистральных сосудов, модулируемое пульсовой волной, а тенденция к уве-

Таблица 2. Показатели микроциркуляции при 10-кратном воздействии ЭМИ КВЧ
Table 2. Microcirculation indicators with 10-fold exposure to EHF EMR

Группы	Аэ, у.е.	Ан, у.е.	Ам, у.е.	Ад, у.е.	Ас, у.е.
Контроль	6,15±0,45	5,69±0,36	5,43±0,43	5,26±0,31	5,58±0,44
КВЧ-воздействие	10,25±0,42 p=0,013	8,71±0,38 p=0,016	8,06±0,24 p=0,011	6,83±1,22 p=0,125	7,12±0,28 p=0,016

Примечание: Аэ — амплитуда колебаний эндотелиального ритма, Ан — амплитуда колебаний нейрогенного ритма, Ам — амплитуда колебаний миогенного ритма, Ад — амплитуда колебаний дыхательного ритма, Ас — амплитуда колебаний пульсового ритма; p — уровень достоверности различий по сравнению с таковыми в контрольной группе.

Note: Аэ — amplitude of endothelial rhythm oscillations, Ан — amplitude of neurogenic rhythm oscillations, Ам — amplitude of myogenic rhythm oscillations, Ад — amplitude of respiratory rhythm oscillations, Ас — amplitude of pulse rhythm oscillations; p — is the level statistically significant compared to those in the control group.

Таблица 3. Показатели микроциркуляции при действии 10-кратного ЭМИ КВЧ
Table 3. Microcirculation indicators under the action of 10-fold EHF EMR

Группа	ПМ, перф. ед.	СКО, у.е.	Кв, у.е.
Контроль	11,33±0,49	5,00±1,09	44,15±9,43
КВЧ-воздействие	18,34±0,77 p=0,012	9,14±0,75 p=0,012	50,46±4,48 p=0,533

Примечание: ПМ — показатель микроциркуляции, СКО — среднее квадратичное отклонение, Кв — коэффициент вариации; $p \leq 0,05$ — достоверность различий по сравнению с таковыми в контрольной группе.

Note: ПМ — microcirculation indicator; СКО — standard deviation, Кв — coefficient of variation; $p \leq 0,05$ — statistically significant compared to compared to those in the control group.

личению показателя Ад свидетельствовала об увеличении кровенаполнения венозного звена микроциркуляции [8].

Кроме осцилляторных показателей микроциркуляции изменялись и неосцилляторные показатели (табл. 3). Так, увеличился интегральный показатель тканевой перфузии — ПМ на 61,9% ($p=0,012$), СКО — на 82,8% ($p=0,012$), а Кв — на 14,3% по сравнению с контрольной группой.

Известно, что ПМ отражает усредненную величину перфузии в капиллярах, артериолах и венах [11], СКО — среднюю модуляцию кровотока во всех частотных диапазонах, а Кв указывает на процентный вклад вазомоторного компонента в общую модуляцию тканевого кровотока [11].

В целом можно заключить, что при 10-кратном КВЧ-воздействии происходило достоверное изменение активности почти всех звеньев регуляции микрососудистого тонуса, что выражалось в увеличении эндотелий-зависимой вазодилатации, снижении периферического сопротивления, увеличении притока крови в нутритивное микрососудистое русло, улучшении венолярного оттока.

Таким образом, в ходе настоящего исследования у крыс, подвергшихся 10-кратному КВЧ-воздействию, были отмечены изменения функционирования системы микроциркуляции, что сопровождалось изменениями тканевого окислительного метаболизма.

В соответствии с принципом Фика усиление тканевого окислительного метаболизма (маркером чего является увеличение РО) связано с усилением кровообращения

в микрососудах (сопровождающимся расширением артериол) и/или с увеличением поверхности диффузии и транскапиллярного обмена [1]. Подтверждением этому могут являться результаты корреляционного анализа рангового порядка Спирмена (рис. 1). Так, среди показателей окислительного метаболизма в контрольной группе животных РО коррелирует с ПМ ($r=0.59$, $p<0,05000$), НАДН — с Аэ ($r=0.79$, $p<0,05000$) и Кв ($r=0.61$, $p<0,05000$). Применение кластерного анализа (метод полных связей) позволило выделить два основных кластера Кв и РО, которые объединяют группу показателей окислительного метаболизма и СКО и группу показателей микроциркуляции (рис. 2).

В группе животных после 10-кратного КВЧ-воздействия происходит перестройка корреляционных связей, и на первый план выходят Кв, имеющих сильные отрицательные связи со всеми показателями тканевого метаболизма: ФАД ($r=-0.75$, $p<0,05$), НАДН ($r=-0.99$, $p<0,05$), РО ($r=-0.64$, $p<0,05$). Также сильную отрицательную связь демонстрирует Аэ с ФАД ($r=-0.84$, $p<0,05$) (рис. 1). В дендрограмме кластерного анализа происходит незначительная рокировка внутри кластеров (рис. 2), сопровождающаяся увеличением расстояния между кластерами. Известно, что Кв является итоговым расчетным показателем микроциркуляции, учитывающим отношение между ПМ и СКО. В свою очередь, Аэ (отражающий релизинг NO эндотелием), увеличиваясь значительно (на 66,6%), чем все остальные показатели микроциркуляции, вносит большой вклад в повышение интег-

Spearman Rank Order Correlations (Spreadsheet2.sta)											
MD pairwise deleted											
Marked correlations are significant at $p < .05000$											
Variable	Аз	Ан	Ам	Ад	Ас	ПМ	СКО	Кв	НАДН	РО	ФАД
Аз	1,000000	0,678571	0,571429	0,035714	0,107143	0,259218	0,500000	-0,321429	0,795531	0,198206	0,321429
Ан	0,678571	1,000000	0,821429	0,500000	0,571429	0,366481	0,785714	0,142857	0,286034	0,252262	-0,071429
Ам	0,571429	0,821429	1,000000	0,821429	0,750000	0,527375	0,642857	0,071429	0,411173	0,216225	0,214286
Ад	0,035714	0,500000	0,821429	1,000000	0,857143	0,527375	0,357143	0,107143	0,062570	0,126131	0,178571
Ас	0,107143	0,571429	0,750000	0,857143	1,000000	0,813408	0,142857	0,178571	0,080447	0,450469	-0,107143
ПМ	0,259218	0,366481	0,527375	0,527375	0,813408	1,000000	-0,196648	-0,098324	0,351230	0,599793	-0,026816
СКО	0,500000	0,785714	0,642857	0,357143	0,142857	-0,196648	1,000000	0,250000	0,080447	-0,162169	0,035714
Кв	-0,321429	0,142857	0,071429	0,107143	0,178571	-0,098324	0,250000	1,000000	-0,616760	-0,018019	-0,642857
НАДН	0,795531	0,286034	0,411173	0,062570	0,080447	0,351230	0,080447	-0,616760	1,000000	0,099214	0,634637
РО	0,198206	0,252262	0,216225	0,126131	0,450469	0,599793	-0,162169	-0,018019	0,099214	1,000000	-0,558581
ФАД	0,321429	-0,071429	0,214286	0,178571	-0,107143	-0,026816	0,035714	-0,642857	0,634637	-0,558581	1,000000

А

Spearman Rank Order Correlations (Spreadsheet2.sta)											
MD pairwise deleted											
Marked correlations are significant at $p < .05000$											
Variable	Аз КВЧ	Ан КВЧ	Ам КВЧ	Ад КВЧ	Ас КВЧ	ПМ КВЧ	СКО КВЧ	Кв КВЧ	НАДН КВЧ	РО КВЧ	ФАД КВЧ
Аз КВЧ	1,000000	0,028857	0,338876	-0,035556	0,248890	0,059934	0,213571	0,517280	-0,422969	-0,267559	-0,838351
Ан КВЧ	0,028857	1,000000	0,315674	0,310078	0,436324	0,524336	0,301553	-0,097779	0,094179	0,204446	-0,026667
Ам КВЧ	0,338876	0,315674	1,000000	0,453041	0,066299	-0,017660	0,174780	-0,008869	0,071597	-0,026608	-0,381383
Ад КВЧ	-0,035556	0,310078	0,453041	1,000000	0,279379	-0,358804	0,492786	0,124584	-0,143670	-0,320358	-0,266965
Ас КВЧ	0,248890	0,436324	0,066299	0,279379	1,000000	-0,137320	0,230855	0,293661	-0,336726	-0,436042	-0,151280
ПМ КВЧ	0,059934	0,524336	-0,017660	-0,358804	-0,137320	1,000000	-0,004435	-0,266669	0,304960	0,444449	0,053334
СКО КВЧ	0,213571	0,301553	0,174780	0,492786	0,230855	-0,004435	1,000000	0,080178	-0,053936	0,213809	-0,338531
Кв КВЧ	0,517280	-0,097779	-0,008869	0,124584	0,293661	-0,266669	0,080178	1,000000	-0,991031	-0,642857	-0,750000
НАДН КВЧ	-0,422969	0,094179	0,071597	-0,143670	-0,336726	0,304960	-0,053936	-0,991031	1,000000	0,684712	0,666694
РО КВЧ	-0,267559	0,204446	-0,026608	-0,320358	-0,436042	0,444449	0,213809	-0,642857	0,684712	1,000000	0,392857
ФАД КВЧ	-0,838351	-0,026667	-0,381383	-0,266965	-0,151280	0,053334	-0,338531	-0,750000	0,666694	0,392857	1,000000

Б

Рис. 1. Корреляции рангового порядка Спирмена показателей микроциркуляции и тканевого метаболизма у крыс контрольной (А) и экспериментальной (Б) групп.

Fig. 1. Correlations of Spearman's rank order of microcirculation and tissue metabolism in rats of the control (A) and experimental (B) groups.

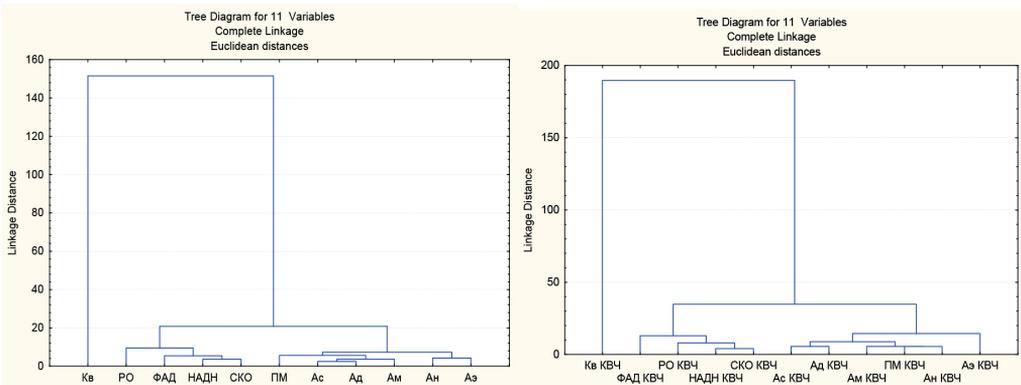


Рис. 2. Результаты кластерного анализа показателей микроциркуляции и окислительного метаболизма в контрольной (слева) и экспериментальной (после 10-кратного КВЧ-воздействия, справа) группах.

Fig. 2. Results of cluster analysis of microcirculation and oxidative metabolism indicators in the control (left) and experimental (after 10-fold EHF exposure, right) groups.

ральных показателей микроциркуляции, таких как ПМ, СКО и Кв. Поскольку NO образуется при ферментативном окислении L-аргинина, который катализируется NO-синтазами, при этом кофакторами в ре-

акции выступают НАДФН, ФАД, тетрагидриобиптерин и др., становится очевидной перспективность дальнейших исследований физиологического взаимодействия этих показателей.

Выводы

1. При 10-кратном воздействии низкоинтенсивным ЭМИ КВЧ увеличиваются концентрация и интенсивность флюоресценции НАДН, повышаются ФАД и РО, что свидетельствует о росте потребности клеток в АТФ, преобладании окислительного фосфорилирования над другими процессами и активации дыхательной цепи.

2. В условиях 10-кратного КВЧ-воздействия отмечается значимое изменение активности всех звеньев регуляции микрососудистого тонуса (за исключением дыхательных ритмов), что выражается в увели-

чении эндотелий-зависимой вазодилатации, снижении периферического сопротивления, повышении притока крови в нутритивное микрососудистое русло и улучшении веноулярного оттока.

3. Установлены корреляционные связи между показателями окислительного тканевого метаболизма и микроциркуляцией в коже крыс, что открывает перспективы к дальнейшему исследованию, направленному на выявление возможного существования причинно-следственной связи между данными процессами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Кирилина Т.В., Красников Г.В., Танкананг А.В., Пискунова Г.М., Чемерис Н.К. Пространственная синхронизация колебаний кровотока в системе микроциркуляции кожи человека. *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*. 2009;3:32–36. [Kirilina T.V., Krasnikov G.V., Tankanang A.V., Piskunova G.M., Chemeris N.K. Prostranstvennaya sinhronizatsiya kolebanij krovotoka v sisteme mikro-cirkulyacii kozhi cheloveka [Spatial synchronization of the blood flow oscillations in human skin micro-circulation]. *Regionarnoe krovoobrashchenie i mikro-cirkulyaciya [Regional blood circulation and microcirculation]*. 2009;3:32–36. (In Russian)].
2. Козлов В.И., Корси Л.В., Соколов В.Г. *Биофизические принципы лазерной доплеровской флоуметрии. Применение лазерной доплеровской флоуметрии в медицинской практике*: Мат-лы второго Всеросс. симпозиума. М., 1998:17–24. [Kozlov V.I., Korsi L.V., Sokolov V.G. *Biofizicheskie principy lazernoj dopplerovskoj floumetrii. Primenenie lazernoj dopplerovskoj floumetrii v medicinskoj praktike [Biophysical principles of laser Doppler flowmetry. Application of laser Doppler flowmetry in medical practice]*: Mat-ly vtorogo Vseross. simpoziuma. M., 1998:17–24. (In Russian)].
3. Козлов В.И., Соколов В.Г. *Исследование колебаний кровотока в системе микроциркуляции. Применение лазерной доплеровской флоуметрии в медицинской практике*: Мат-лы второго Всеросс. симпозиума. М., 1998:8–13. [Kozlov V.I., Sokolov V.G. *Issledovanie kolebanij krovotoka v sisteme mikro-cirkulyacii. Primenenie lazernoj dopplerovskoj floumetrii v medicinskoj praktike [Investigation of blood flow fluctuations in the micro-circulation system. Application of laser Doppler flowmetry in medical practice]*: Mat-ly vtorogo Vseross. simpoziuma [Proceedings of the Second All-Russian Symposium]. Moscow, 1998:8–13. (In Russian)].
4. Крупаткин А.И. *Функциональная диагностика состояния микроциркуляторно-тканевых систем: колебания, информация, нелинейность*: рук-во для врачей. М.: Либроком, 2014:498. [Krupatkin A.I. *Funkcionalnaya diagnostika sostoyaniya mikro-cirkulyatorno-tkanevykh sistem: kolebaniya, informatsiya, nelinejnost [Functional diagnostics of the state of microcirculatory and tissue systems: fluctuations, information, nonlinearity]*: ruk-vo dlya vrachej [guide for doctors]. Moscow: Librokom Publ., 2014:498. (In Russian)].
5. Крупаткин А.И. Функциональная оценка периваскулярной иннервации конечностей с помощью лазерной доплеровской флоуметрии. *Физиология человека*. 2004;30(1):99–104. [Krupatkin A.I. *Funkcionalnaya ocenka perivaskulyarnoj innervatsii konechnostej s pomoshchyu lazernoj dopplerovskoj floumetrii [Functional evaluation of the perivascular innervation of the skin of the extremities using laser doppler flowmetry]*. *Fiziologiya cheloveka [Human Physiology]*. 2004;30(1):99–104. (In Russian)].
6. Крупаткин А.И., Рогаткин Д.А., Сидоров В.В. *Клинико-диагностические показатели при комплексном исследовании микрогемодинамики и транспорта кислорода в системе микроциркуляции. Гемореология и микроциркуляция: мат-лы шестой Междунар. конференции*. Ярославль, 2007:106. [Krupatkin A.I., Rogatkin D.A., Sidorov V.V. *Kliniko-diagnosticheskie pokazateli pri kompleksnom issledovanii mikrogemodinamiki i transporta kisloroda v sisteme mikro-cirkulyacii*. *Gemorologiya i mikro-cirkulyaciya: mat-ly shestoj Mezhduнар. konferencii*. Yaroslavl, 2007:106. (In Russian)].

- Gemoreologiya i mikrocirkulyaciya [Clinical and diagnostic indicators in the complex study of microhemodynamics and oxygen transport in the microcirculation system. Hemorheology and Microcirculation]:* matly shestoј Mezhdunar. konferencii [Proceedings of the Sixth International Conference]. Yaroslavl, 2007:106 (In Russian)].
7. Крупаткин А.И., Сидоров В.В. *Лазерная доплеровская флоуметрия микроциркуляции крови*. М.: Медицина, 2005:125 [Krupatkin A.I., Sidorov V.V. *Lazernaya dopplerovskaya floumetriya mikrocirkulyacii krovі* [Laser Doppler flowmetry of blood microcirculation]. Moscow: Medicina Publ., 2005:125. (In Russian)].
 8. Крупаткин А.И., Сидоров В.В., Баранов В.В. Колебательный контур регуляции линейной скорости капиллярного кровотока. *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*. 2007;3(23):52–58. [Krupatkin A.I., Sidorov V.V., Baranov V.V. Kolebatel'nyj kontur regulyacii linejnoј skorosti kapillyarnogo krovotoka [The oscillatory circuit for the control of velocity indices of capillary blood flow and tone organization of precapillary distributive microvessels]. *Regionarnoe krovoobrashchenie i mikrocirkulyaciya* [Regional blood circulation and microcirculation]. 2007;3(23):52–58. (In Russian)].
 9. Курганова Л.Н. Перекисное окисление липидов — одна из возможных компонент быстрой реакции на стресс. *Вестник Нижегородского Университета им. Н.И. Лобачевского. Серия Биология*. 2001;2:74–76. [Kurganova L.N. Perekisnoe okislenie lipidov — odna iz vozmozhnyh komponent bystroј reakcii na stress [Lipid peroxidation is one of the possible components of a rapid reaction to stress]. *Vestnik Nizhegorodskogo Universiteta im. N.I. Lobachevskogo. Seriya Biologiya* [Vestnik of Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod. Biology]. 2001;2:74–76. (In Russian)].
 10. Лукина М.М., Ширманова М.В., Сергеева Т.Ф., Загайнова Е.В. Метаболический имиджинг в исследовании онкологических процессов (обзор). *Современные технологии в медицине*. 2016;8(4):113–121. [Lukina M.M., Shirmanova M.V., Sergeeva T.F., Zagaynova E.V. Metabolicheskij imidzhing v issledovanii onkologicheskikh processov (obzor) [Metabolical imaging for the study of oncological processes (review)]. *Sovremennye tehnologii v medicine* [Modern technologies in medicine]. 2016;8(4):113–121. (In Russian)]. DOI: 10.17691/stm2016.8.4.16.
 11. Москвин С.В., Антипов Е.В., Зарубина Е.Г., Рязанова Е.А. Эффективность кислородного обмена после применения лазерофореза различных гелей на основе гиалуроновой кислоты. *Вестник Эстетической Медицины*. 2011;10(3):48–55. [Moskvin S.V., Antipov E.V., Zarubina E.G., Ryzanova E.A. Effektivnost kislородnogo obmena posle primeneniya lazeroforeza razlichnyh gelej na osnove gialuronovoj kisloty [Oxygen exchange effectiveness after application of different gels based on hyaluronic acid laser-photolysis]. *Vestnik Esteticheskoj Mediciny* [Bulletin of Aesthetic Medicine]. 2011;10(3):48–55. (In Russian)].
 12. Новиков В.Е., Левченкова О.С., Пожилова Е.В. Роль активных форм кислорода в физиологии и патологии клетки и их фармакологическая регуляция. *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. 2014;12(4):13–21. [Novikov V.E., Levchenkova O.S., Pozhilova Ye.V. Rol aktivnyh form kislороda v fiziologii i patologii kletki i ih farmakologicheskaya regulyaciya [Role of reactive oxygen species in cell physiology and pathology and their pharmacological regulation]. *Obzory po klinicheskoj farmakologii i lekarstvennoj terapii* [Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy]. 2014;12(4):13–21. (In Russian)].
 13. Серёгина Е.С., Стельмашук О.А., Пьявченко Г.А., Воробьев Е.В., Кузнецова Е.А., Алексеев А.Г., Жеребцов Е.А., Подмастерьев К.В., Дунаев А.В. Оценка влияния антиоксидантных веществ на метаболические процессы клеток головного мозга методом флуоресцентной спектроскопии. *Физика и радиоэлектроника в медицине и экологии*. 2018;1:62–66. [Seregina E.S., Stelmaschuk O.A., Pjavchenko G.A., Vorobyev E.V., Kuznetsova E.A., Alekseev A.G., Zherebtsov E.A., Podmasteriev K.V., Dunaev A.V. Ocenka vliyaniya antioksidantnyh veshchestv na metabolicheskie processy kletok golovnogo mozga metodom fluorescentnoј spektroskopii [Evaluation of the effect of antioxidant substances on the metabolic processes of brain cells by fluorescence spectroscopy]. *Physics and Radio Electronics in Medicine and Ecology*. 2018;1:62–66. (In Russian)].
 14. Чуян Е.Н., Джелдубаева Э.Р. *Низкоинтенсивное миллиметровое излучение: нейроиммуноэндокринные механизмы адаптационных реакций*. Симферополь: ООО «Издательство Типография «Ариал», 2020:624. [Chuyan E.N., Dzheldubaeva E.R. *Nizkointensivnoe millimetrovoe izluchenie: nejroimmunoendokrinye mekhanizmy adaptacionnyh reakcij* [Low-intensity millimeter radiation: neuroimmunoenocrine mechanisms of adaptive reactions]. Simferopol: ООО «Izdatelstvo Tipografiya «Ariall», 2020:624. (In Russian)].
 15. Чуян Е.Н., Раваева М.Ю. Механизмы вазопротекторного действия электромагнитного излучения крайне высокой частоты в условиях хронического гипокINETического стресса. *Биомедицинская радиоэлектроника*. 2017;3:55–65. [Chuyan E.N., Ravaeva M.Yu. Mekhanizmy vazoprotektornogo dejstviya elektromagnitnogo izlucheniya krajne vysokoj chastoty v usloviyah hronicheskogo gipokineticheskogo stressa [Mechanisms of vasoprotective action of extremely high frequency electromagnetic radiation in conditions of chronic hypokinetic stress]. *Biomedicinskaya radioelektronika* [Biomedical radioelectronics]. 2017;3:55–65. (In Russian)].

16. Чуян Е.Н., Трибрат Н.С., Раваева М.Ю., Ананченко М.Н. *Тканевая микрогемодинамика: влияние низкоинтенсивного электромагнитного излучения миллиметрового диапазона*. Симферополь: ООО «Издательство Типография «Ариал», 2017:422. [Chuyan E.N., Tribat N.S., Ravaeva M.Yu., Ananchenko M.N. *Tkanevaya mikrogemodinamika: vliyaniye nizkointensivnogo elektromagnitnogo izlucheniya millimetrovogo diapazona* [Tissue microhemodynamics: the effect of low-intensity electromagnetic radiation in the millimeter range]. Simferopol: ООО «Izdatelstvo Tipografiya «Ariyal», 2017:422. (In Russian)].
17. Mokry M., Gal P., Harakalova M., Hutnanova Z., Kusnir J., Mozes S., Sabo J. Experimental study on predicting skin flap necrosis by fluorescence in the FAD and NADH bands during surgery. *Photochem Photobiol.* 2007;83(5):1193–1196. DOI: 10.1111/j.1751-1097.2007.00132.x.
18. NADH fluorescence: from animal models to human studies. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2007;292(2):615–640. DOI: 10.1152/ajpcell.00249.2006.
19. Stefanovska A., Bracic M., Kvernmo H.D. Wavelet analysis of oscillations in peripheral blood circulation measured by Doppler technique. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 1999; 46(10):1230–1239. DOI: 10.1109/10.790500.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Раваева Марина Юрьевна*, к.б.н., доц., ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского»;
e-mail: ravaevam@yandex.ru

Marina Yu. Ravaeva*, Cand. Sci. (Biol.), Assoc. Prof., V.I. Vernadsky Crimean Federal University;
e-mail: ravaevam@yandex.ru

Черетаев Игорь Владимирович, к.б.н., ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского»;
e-mail: cheretaev86@yandex.ru

Igor V. Cheretaev, Cand. Sci. (Biol.), V.I. Vernadsky Crimean Federal University;
e-mail: cheretaev86@yandex.ru

Чуян Елена Николаевна, д.б.н., проф., ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского»;
e-mail: elena-chuyan@rambler.ru

Elena N. Chuyan, Dr. Sci. (Biol.), Prof., V.I. Vernadsky Crimean Federal University;
e-mail: elena-chuyan@rambler.ru

Галенко-Ярошевский Павел Александрович, д.м.н., проф., чл.-корр. РАН, ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России;
e-mail: Galenko.Yarochevsky.@gmail.com

Pavel A. Galenko-Yaroshvskii, Dr. Sci. (Med.), Prof., Corr. Member of RAS, Kuban State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: Galenko.Yarochevsky.@gmail.com

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

ВОЗМОЖНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ НИЗКОЧАСТОТНОГО ИМПУЛЬСНОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ В КАЧЕСТВЕ МОДИФИКАТОРА СТРЕСС-ИНДУЦИРОВАННОГО СОСТОЯНИЯ ОРГАНИЗМА ЖИВОТНЫХ, ВЫЗВАННОГО ВВЕДЕНИЕМ АДРЕНАЛИНА ГИДРОХЛОРИДА

Ю.Е. Ананьева^{1*}, О.А. Захарова¹, В.Д. Федотов², О.М. Лабынцева¹

¹ ФГУП «Российский федеральный ядерный центр — Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной физики»
607190, Российская Федерация, Нижегородская обл., Саров, ул. Пушкина, 3

² ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России
603005, Российская Федерация, Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, 10/1

В работе приведены результаты исследований прекондиционирующего действия разных режимов импульсного магнитного поля (ИМП) на биохимические показатели крови крыс, подвергнутых адреналовой токсемии. Установлено, что воздействие ИМП приводит к развитию адаптивных реакций, однако скорость их включения может быть различной в зависимости от выбранного режима. Показана возможность применения низкочастотного импульсного магнитного поля в качестве протектора стресс-индуцированного состояния, вызванного адреналовой токсемией.

Ключевые слова: импульсное магнитное поле, адреналовая токсемия, резистентность, параметры крови

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Ананьева Ю.Е., Захарова О.А., Федотов В.Д., Лабынцева О.М. Возможность применения низкочастотного импульсного магнитного поля в качестве модификатора стресс-индуцированного состояния животных, вызванного введением адреналина гидрохлорида. *Биомедицина*. 2023;19(4):47–55. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-19-4-47-55>

Поступила 05.06.2023

Принята после доработки 03.09.2023

Опубликована 10.12.2023

USE OF LOW-FREQUENCY PULSED MAGNETIC FIELD TO MODIFY THE STRESS-INDUCED ANIMAL HEALTH CAUSED BY EPINEPHRINE HYDROCHLORIDE

Yuliya E. Ananieva^{1*}, Olga A. Zakharova¹, Vasilii D. Fedotov², Olga M. Labyntseva¹

¹ Russian Federal Nuclear Center — All-Russian Research Institute of Experimental Physics
607190, Russian Federation, Nizhny Novgorod Region, Sarov, Pushkina Str., 3

² Volga Research Medical University of the Ministry of Health Care of Russia
603005, Russian Federation, Nizhny Novgorod, Minina and Pozharskogo Sq., 10/1

In this work, we investigate the preconditioning action of various modes of pulsed magnetic field (PMF) on the blood biochemical parameters of rats exposed to adrenal toxemia. PMF was shown to trigger adaptive response; however, its rate can differ depending on the selected PMF mode. The possibility of using low-frequency PMF as a protector of stress-induced conditions caused by adrenal toxemia is demonstrated.

Keywords: pulsed magnetic field, adrenal toxemia, resistance, blood parameter

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

For citation: Ananieva Yu.E., Zakharova O.A., Fedotov V.D., Labyntseva O.M. Use of Low-Frequency Pulsed Magnetic Field to Modify the Stress-Induced Animal Health Caused by Epinephrine Hydrochloride. *Journal Biomed.* 2023;19(4):47–55. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-19-4-47-55>

Submitted 05.06.2023

Revised 03.09.2023

Published 10.12.2023

Введение

Одной из важнейших задач здравоохранения в наши дни является профилактика заболеваний, направленная на активизацию защитных сил организма и предупреждение воздействия отрицательных факторов на здоровье человека. Применение многих фармакологических средств сопровождается большим количеством нежелательных явлений, связанных с выходом организма за пределы зоны устойчивости [5, 12].

Нарушение жизнедеятельности организма так или иначе связано с изменением функционирования клеток. Каким бы ни был повреждающий агент и на какие бы клетки он ни действовал, ответ клеток по ряду показателей остается неспецифическим. Причины такого стереотипа изменений в клетках при их повреждении заключаются в том, что сами молекулярно-клеточные механизмы повреждения клеток сходны, даже если причины, вызвавшие повреждение, различны [6, 7, 13].

Большую актуальность приобретает изучение проблемы стресса как универсального фактора развития каскада патогенетических реакций, приводящих к формированию различной патологии. По мнению исследователей, главными стресс-реализующими системами организма являются симпатно-адреналовая и гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая [4]. Активация этих систем, безусловно, играет большую роль в нарушении метаболизма, а также является одним из факторов риска развития популяционно значимых заболеваний (артериальной гипертензии, ишемической

болезни сердца, сахарного диабета 2 типа и др.) [17]. Одним из ведущих патогенетических механизмов формирования патологии является выброс катехоламинов в кровоток, что сопровождается истощением коркового слоя надпочечников, гиперкоагуляцией, гипергликемией, вазоконстрикцией и т.д., что клинически может проявляться развитием инфаркта в специализированных тканях (миокарде, головном мозге и др.), нарушениями ритма сердца и феноменом внезапной смерти [4]. В этой связи поиск новых, в т.ч. немедикаментозных, методов коррекции гиперкатехоламинемии представляется очень важной задачей.

В клиническую практику был внедрен метод индивидуализированной низкочастотной импульсной магнитотерапии эссенциальной артериальной гипертензии на основе установки УМТИ-3Ф [14].

На базе ФГУП «РФЯЦ – ВНИИЭФ» ведутся работы, направленные на исследование биоэффектов от действия импульсных магнитных полей, генерируемых установкой нового поколения «Бутон», созданной на основе магнитогенератора УМТИ-3Ф. В работах [8, 10] доказана роль данных магнитных полей в обеспечении устойчивости организма к гипоксии.

Целью нашей работы явилось исследование воздействия низкочастотного импульсного магнитного поля, генерируемого установкой «Бутон», на адаптационные реакции организма при моделировании адреналовой токсемии.

Материалы и методы

Исследование проводилось на белых беспородных половозрелых крысах-самцах массой 200–250 г. Животные были закуплены в филиале «Андреевка» ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России» (Московская обл.). Животные содержались в виварии, в клетках по 4 особи при свободном доступе к пище и воде и естественной смене дня и ночи.

В качестве источника импульсного ИМП использовали генератор ИМП «Бутон» со значением модуля магнитной индукции в центре рабочей зоны индуктора до $3,5 \pm 0,2$ мТл, формой сигнала вида затухающей синусоиды $U(t) = U_0 (\sin \omega t \exp(-\alpha t))$, при $U_0 = 150\text{--}300$ В, частотой ~ 100 Гц, частотой следования импульсов $1,0 \pm 0,1$ Гц. Тестирование параметров магнитного поля проводили однокомпонентным тесламетром ТП2-2У.

Для обработки магнитным полем животных помещали в контейнер с прозрачными стенками без ограничения движения. Контейнер размещали в рабочей зоне используемой установки. Обработку магнитным полем осуществляли totally в течение 30 мин со сменой максимального значения модуля магнитной индукции каждые 10 мин.

Животные были разделены на 7 групп. 1 группа — интактные животные. Моделирование адреналовой токсемии [4, 9] осуществляли путем внутрибрюшинного введения 0,1% р-ра адреналина гидрохлорида в дозе 0,1 мг/кг (2 группа). В качестве контроля ко 2-й группе служили животные, которым внутрибрюшинно вводили физ. р-р (3 группа). Предварительно в течение трех дней животных 4–7 групп подвергали 30-минутному воздействию низкочастотного ИМП в режиме I — $1,5\text{--}3,2\text{--}1,5$ мТл (4 группа) и режиме II — $3,2\text{--}1,5\text{--}3,2$ мТл (5 группа) с последующим введением адреналина в дозе 0,1 мг/кг после окончания

последнего сеанса воздействия животным 6 и 7 группы. Введение адреналина осуществляли через 15 мин после последнего сеанса ИМП.

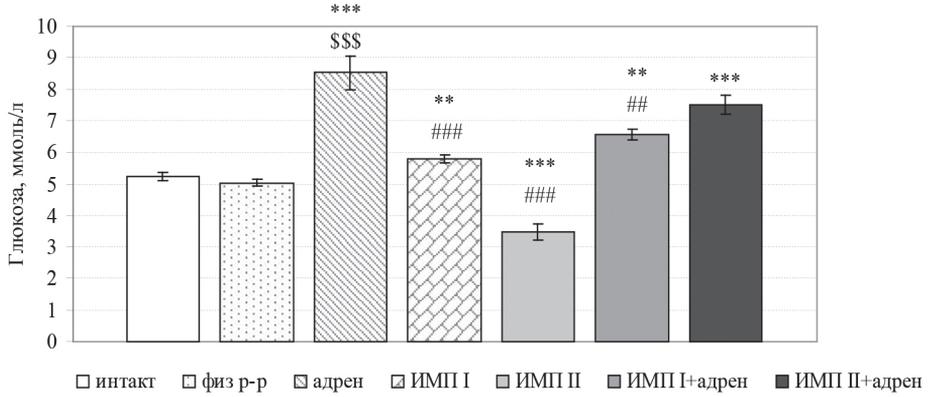
Забор крови у крыс осуществляли путем декапитации спустя 1 ч после воздействия исследуемых факторов.

Методы исследования включали изменение электрофоретической подвижности эритроцитов методом микроэлектрофореза [18], концентрации малонового диальдегида в эритроцитах фотометрическим методом [1], количественного содержания глюкозы в плазме крови энзиматическим колориметрическим методом (набор «Глюкоза-Ольвекс», Санкт-Петербург), активности аспаргатаминотрансферазы (набор «АСТ-РФ-ОЛЬВЕКС», Санкт-Петербург) в сыворотке крови фотометрическим методом, а также лактатдегидрогеназы (набор «ЛДГ-2-ОЛЬВЕКС», Санкт-Петербург) в сыворотке крови оптимизированным кинетическим методом.

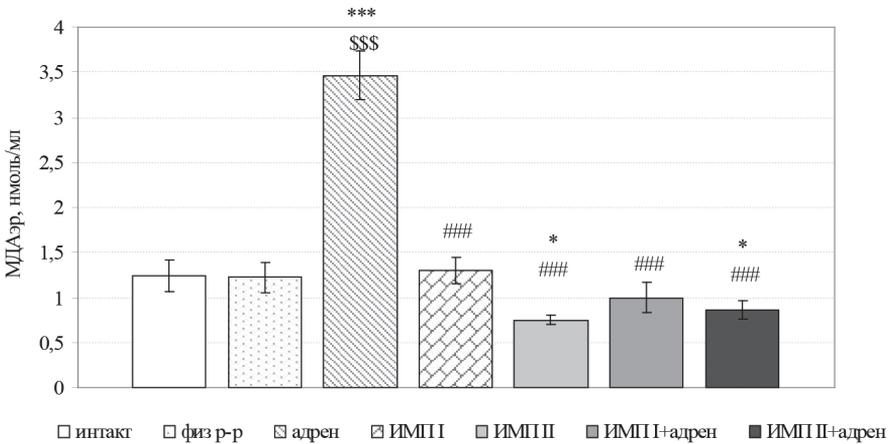
Проверка на нормальность распределения проведена во всех экспериментальных сериях с использованием W-теста Шапиро — Уилка [2, 11]. Оценка статистической значимости различий средних значений показателей двух независимых групп проведена с использованием t-критерия Стьюдента (с поправкой Бонферрони). Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение

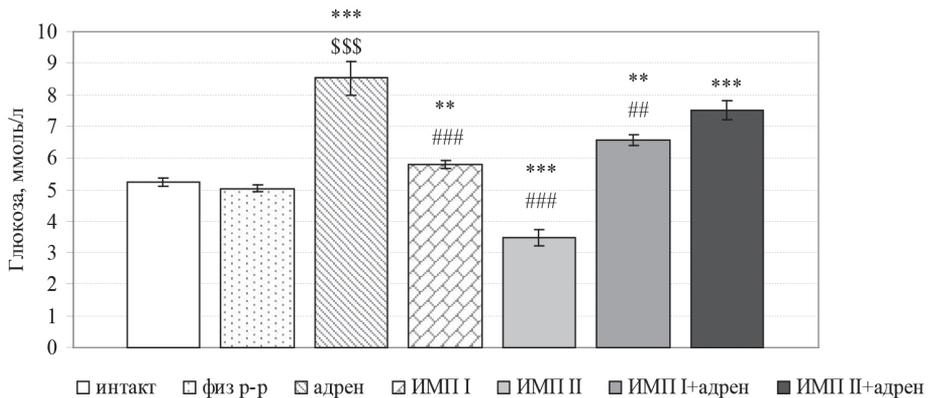
Результаты проведенных исследований (рис.) свидетельствуют о том, что в ответ на введение экзогенного адреналина происходило развитие стереотипной реакции клеток на стресс [20]. Зарегистрировано снижение электрофоретической подвижности эритроцитов (ЭФПЭ) на 42% ($p \leq 0,001$), увеличение содержания вторичного продукта ПОЛ — малонового диальдегида (МДАэр) на 179% ($p \leq 0,001$), повышение уровня глюкозы в крови на 62% ($p \leq 0,001$),



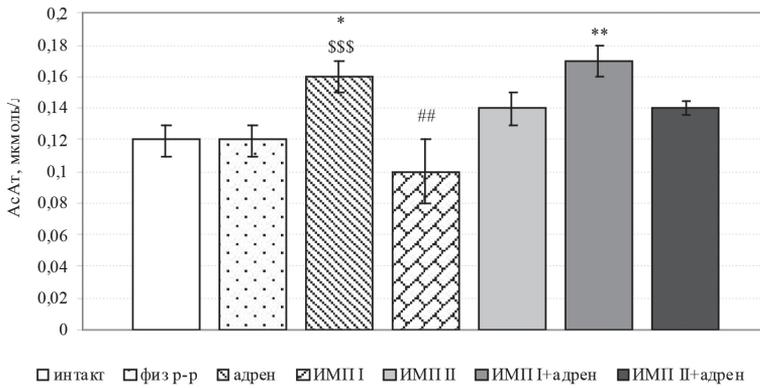
Электрофоретическая подвижность эритроцитов
Electrophoretic mobility of erythrocytes



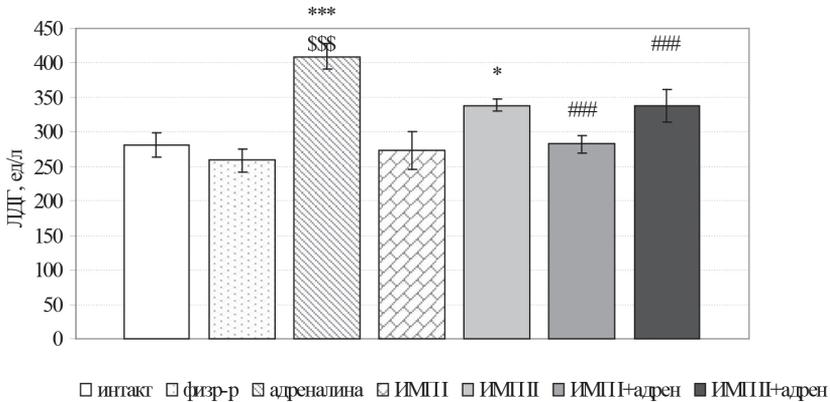
Содержание малонового диальдегида в эритроцитах
Malondialdehyde in red blood cells



Содержание глюкозы в плазме крови
Glucose in blood plasma



Активность аспаратаминотрансферазы (AsAt) в сыворотке крови
 Activity Aspartate Aminotransferase (AsAt) in blood serum



Активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в сыворотке крови
 Activity lactate dehydrogenase (LDG) in blood serum

Рис. (с. 50–51). Изменение биохимических показателей крови после действия низкочастотного импульсного магнитного поля в разных режимах.

Примечание: * — статистически значимые различия по отношению к интактной группе, $p \leq 0,05$;

** — статистически значимые различия по отношению к интактной группе, $p \leq 0,01$;

*** — статистически значимые различия по отношению к интактной группе, $p \leq 0,001$;

\$\$\$ — статистически значимые различия по отношению к группе физ. р-р, $p \leq 0,001$;

— статистически значимые различия по отношению к группе адреналин, $p \leq 0,01$;

— статистически значимые различия по отношению к группе адреналин, $p \leq 0,001$.

Fig. (pp. 50–51). Changes in blood biochemical parameters after the action low-frequency pulsed magnetic field in different modes.

Note: * — statistically significant differences compared to the intact group, $p \leq 0,05$;

** — statistically significant differences compared to the intact group, $p \leq 0,01$;

*** — statistically significant differences compared to the intact group, $p \leq 0,001$;

\$\$\$ — statistically significant differences compared to the group saline solution, $p \leq 0,001$;

— statistically significant differences compared to the group adrenaline, $p \leq 0,01$;

— statistically significant differences compared to the group adrenaline, $p \leq 0,001$.

а также активности аспартаминотрансферазы на 33% ($p \leq 0,05$) и лактатдегидрогеназы на 55% ($p \leq 0,001$) относительно контрольного уровня.

Применение импульсного магнитного поля в режиме I в качестве модификатора стресс-индуцированного состояния приводило к нормализации всех исследуемых показателей. Несмотря на то что уровень глюкозы в крови относительно интактных значений оставался повышенным (на 25%, $p \leq 0,01$), импульсное магнитное поле способствовало снижению уровня глюкозы в крови относительно группы животных, которым вводили адреналин (на 23%, $p \leq 0,01$). Получено увеличение активности фермента аспартаминотрансферазы в сыворотке крови на 13% ($p \leq 0,01$) по отношению к группе «Адреналин». Возможным объяснением увеличения активности ферментов, связанных с энергообеспечением клеток, может быть изменение потребности организма в продуктах реакции, катализируемой этим ферментом в соответствующем органе, и, прежде всего, в поддержании энергообеспечения клеток. Аминотрансферазы регулируют энергетическое звено организма, катализируя переаминирование аминокислот, которые как субстрат входят в запасной путь цикла Кребса для быстрого и короткого пути выработки энергии при «острой» ее нехватке [3]. Таким образом, импульсное магнитное поле в заданном режиме способствовало повышению резистентности организма к стрессовому воздействию, вызывая включение защитных реакций, направленных на мобилизацию энергетических ресурсов организма.

Обращает внимание тот факт, что само по себе воздействие трехдневного курса импульсного магнитного поля в режиме I не вызывало значимых изменений в организме животных. Исключение составляет уровень глюкозы в плазме крови, который превышал на 10% ($p \leq 0,01$) интактный по-

казатель. Известно, что эндокринная система входит в число наиболее чувствительных к магнитному полю систем организма. Вероятной причиной повышения уровня глюкозы в крови под воздействием импульсного магнитного поля в данном режиме может быть активация катаболического гормона глюкагона с последующим запуском процессов гликогенолиза и гликонеогенеза с образованием глюкозы и выходом ее в кровь [15].

Предварительное воздействие импульсного магнитного поля в режиме II ослабляло эффекты адреналина, способствуя включению защитно-приспособительных реакций, направленных на нормализацию электрокинетических и структурно-функциональных характеристик мембраны (рост ЭФПЭ на 42%, $p \leq 0,001$, снижение уровня глюкозы и МДАЭр на 12%, $p \leq 0,001$, и 75%, $p \leq 0,05$, соответственно), но не отменяло их. Так, импульсное магнитное поле в режиме II показало свою низкую эффективность в качестве модификатора стрессового состояния, незначительно снижая интенсивность проявления стрессовой реакции организма.

В чистом виде импульсное магнитное поле с заданными характеристиками проявляло себя как раздражитель средней силы. Отмечено снижение электрофоретической подвижности эритроцитов на 25% ($p \leq 0,001$) относительно интакта. Зафиксированное снижение ЭФПЭ, с одной стороны, может являться следствием активации эндокринной системы организма под действием магнитного поля, в результате которой происходит повышение уровня катехоламинов, запускающих модификацию морфофункциональной организации клеток. С другой стороны, известно, что биологическое состояние мембраны клетки напрямую связано с поверхностным зарядом, о наличии которого можно судить по электрофоретической подвижности [5, 16]. Под влиянием магнитных полей может

изменяться активность АТФ-азы, концентрация ионов на внутренней и внешней поверхности мембраны, что изменяет ее свойства [13]. На наличие функциональных изменений в клеточной мембране указывает и полученное в эксперименте снижение уровня малонового диальдегида в эритроците на 60%, $p \leq 0,05$, а также увеличение активности цитозольного фермента ЛДГ в плазме крови крыс на 20% ($p \leq 0,05$) относительно интакта. Зафиксированное снижение уровня глюкозы в крови на 66% ($p \leq 0,001$) относительно интактной группы животных говорит о перестройке энергетического метаболизма клеток под действием физического фактора. Возросшие при стрессе энергетические потребности организма обеспечиваются за счет утилизации глюкозы [3].

Несмотря на то что первичные механизмы воздействия низкочастотного магнитного поля остаются малоизученными, авторы исследований в этой области полагают, что ведущим эффектом является изменение нейрогуморальных и структурно-метаболических процессов на уровне мембран клеток, тканей и систем организ-

ма [19]. Данный концепт был подтвержден нашим исследованием: ИМП с заданными параметрами вызывало напряжение физиологических механизмов обеспечения биологического гомеостаза, развитие общей неспецифической реакции организма с включением энергетических резервов.

Заключение

Анализируя вышеизложенное, можно заключить, что в режиме I магнитное поле повышало устойчивость организма к адреналину, вызывая развитие неспецифической адаптационной реакции, направленной на мобилизацию энергетических ресурсов в клетке, выражающуюся в повышении уровня глюкозы в крови, а также активности аспаратаминотрансферазы в сыворотке крови крыс. Импульсное магнитное поле в режиме II не обладало стресс-протекторными свойствами, но модулировало реакцию организма на действие адреналина, оказывая влияние на проницаемость клеточной мембраны и ее электрокинетические характеристики, ферментативную активность, а также энергетические процессы в клетке.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы и антиоксиданты. *Вестник РАМН*. 1998;7:43–51. [Vladimirov Yu.A. Svobodnye radikal'yi i antioksidanty [Free radicals and antioxidants]. *Vestnik RAMN*. 1998;(7):43–51 (In Russian)].
2. Гланц С.М. *Медико-биологическая статистика: практика*. М.: Наука, 1999:459. [Glants S.M. *Medical and biological statistics: practice*. Moscow: Nauka Publ., 1999:459 (In Russian)].
3. Давыдова О.К., Сирецкая Т.В., Ерофеев А.И., Романькова Ю.В., Носов В.Н. Особенности формирования защитной реакции организма в остром периоде после краткосрочной иммобилизации на основе гематологических и биохимических показателей крови крыс. *Прикладные проблемы безопасности технических и биотехнических систем*. 2016;2:19–23. [Davydova O.K., Siretskaj T.V., Erofeev A.I., Roman'kova Yu.V., Nosov V.N. Osobennosti formirovaniya zaschitnoj reaksii organizma v ostrom periode posle kratkosrochnoj immobilizatsii na osnove gematologicheskikh i biochimicheskikh pokazatelej krovi [Features of the formation of the body's defense reaction in the acute period after short-term immobilization on the basis of hematological and biochemical parameters of rat blood]. *Prikladnye problemy bezopasnosti tehniceskikh i biotehnicheskikh sistem* [Applied problems of safety of technical and biotechnical systems]. 2016;(2):19–23 (In Russian)].
4. Дерюгина А.В., Жемарина Н.В., Иващенко М.Н., Самоделькин А.Г., Игнатъев П.С., Воронина Л.А., Шабалин М.А., Грачева Е.А. Коррекция состояния организма низкоинтенсивным лазерным излучением при моделировании адреналовой токсемии у крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2019;63(4):81–87. [Deryugina A.V., Zhemarina N.V., Ivashchenko M.N., Samodelkin A.G., Ignatyev P.S., Voronina L.A., Shabalin M.A., Gracheva E.A. Korrektsiya sostoyaniya organizma nizkointensivnyim lazernym izlucheniem pri modelirovanii adrenalovoi toxemii u kryс

- [Correction of the body state with low-intensity laser irradiation in modeling adrenal toxemia in rats]. *Pathological physiology and experimental therapy*. 2019;63(4):81–87 (In Russian). DOI: 10.25557/0031-2991.
5. Клёсов Р.А., Каркищенко В.Н., Степанова О.И., Баранова О.В. Сравнительное экспериментальное биомоделирование НПВС-индуцированного энтероколита. *Биомедицина*. 2020;16(1):65–81. [Klesov G.A., Karkischenko V.N., Stepanova O.I., Baranova O.V. Sravnitel'noe eksperimental'noe biomodelirovaniye NPVS-inducirovannogo elektrolita [Comparative experimental biomodelling of nsaid0-induced enterocolitis]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2020;16(1):65–81 (In Russian). DOI: 10.33647/2074-5982-16-1-65-81.
 6. Козинец Г.И., Попова О.В., Будник М.И. и др. *Электрический заряд клеток крови*. М.: Практич. медицина, 2007:208. [Kozinets G.I., Popova O.V., Budnik M.I. *Elektricheskij zaryad kletok krovi* [Electric charge of blood cells]. Moscow: Prakticheskaya medicina Publ., 2007:208 (In Russian).
 7. Красников В.Е. *Патология клетки: уч. пособ.* Владивосток: Медицина ДВ, 2008:100. [Krasnikov V.E. *Patologij kletki: uch. posob.* [Cell pathology: textbook]. Vladivostok: Meditsina DV Publ., 2008:100. (In Russian).
 8. Крылов В.Н., Лобкаева Е.П., Ошевенский Л.В., Лабынцева О.М., Захарова О.А., Федотов В.Д., Ананьева Ю.Е., Рохмистрова Е.Г. Возможность применения импульсного магнитного поля в качестве протектора повреждающего действия гипоксии. *Биомедицина*. 2018;(3):90–100. [Krylov V.N., Lobkaeva Ye.P., Oshevskij L.V., Labyntseva O.M., Zaharova O.A., Fedotov V.N., Anan'eva Yu.E., Rohmistrova E.G. Vozmozhnost' primeneniya impul'snogo magnitnogo polya v kachestve protektora povrezhdayushchego dejstviya gipoksii [The possibility of applying a pulsed magnetic field as a protector of damage action of hypoxia]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2018;(3):90–100 (In Russian).
 9. Крылов В.Н. *Механизмы изменения некоторых функций нормального и альтерированного сердца при действии зоотоксинов: автореф. дисс. ... докт. биол. наук*. М., 1990:48. [Krylov V.N. *Mehanizmy izmeneniya nekotoryh funkcij normal'nogo i al'terirovannogo serdca pri dejstvii zootoksinov* [Mechanisms of changes in some functions of the normal and altered heart under the action of zootoxins]. Avtoref. diss. ... Dr. Biol. Sci. Moscow, 1990:48 (In Russian).
 10. Лабынцева О.М., Захарова О.А., Ананьева Ю.Е., Рохмистрова Е.Г., Лобкаева Е.П. Импульсное магнитное поле как средство повышения эффективности тренировочной нормобарической интервальной гипоксии у крыс. *Биомедицина*. 2019;15(2):24–33. [Labyntseva O.M., Zaharova O.A., Anan'eva Yu.E., Rohmistrova E.G., Lobkaeva E.P. Impul'snoe magnitnoe pole kak sredstvo povysh-
 - eniya effektivnosti trenirovochnoj normobaricheskoj interval'noj gipoksii u krys [Pulsed magnetic field as a means of increasing the efficiency of normobaric interval hypoxia training in rats]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2019;15(2):24–33 (In Russian). DOI: 10.33647/2074-5982-15-2-24-33.
 11. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. *Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel*. Киев: Моршон, 2000:319. [Lapach S.N., Chubenko A.V., Babich P.N. *Statisticheskie metody v mediko-biologicheskikh issledovaniyakh s ispolzovaniem Excel*. [Statistical methods in biomedical studies using Excel]. Kiev: Morion Publ. 2000:319. (In Russian).
 12. Литвиненко Т.С., Сафроненко А.В., Ганцгорн Е.В., Куделина О.М., Постникова Е.С., Чотий В.А. Нежелательные лекарственные реакции и методические подходы к их мониторингу. *Биомедицина*. 2021;17(3):56–61. [Litvinenko T.S., Safronenko A.V., Gantsgorn E.V., Kudelina O.M., Postnikova E.S., Chotij V.A. Nezhelatel'nyie lekarstvennyie reaksii i metodicheskie podhody k ih monitoringu [Adverse drug reactions and methodological approaches to their monitoring]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2021;17(3):56–61. (In Russian). DOI: 10.33647/2074-5982-17-3-56-61.
 13. Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Литвинова Л.С. Молекулярные механизмы нарушения взаимодействия эффекторных клеток крови при патологии инфекционной и неинфекционной природы. *Бюллетень СО РАМН*. 2008;4(132):36–48. [Novitsij V.V., Ryzantseva N.V., Litvinova L.S. Molekulyarnyye mehanizmy narusheniya vzaimodejstviya effektivnykh kletok krovi pri patologii infekcionnoj i neinfekcionnoj prirody [Molecular mechanisms of impaired interaction of effector blood cells in infectious and non-infectious pathology]. *Byulleten' SO RAMN*. 2008;4(132):36–48. (In Russian).
 14. *Способ коррекции функционального состояния организма*. Лобкаева Е.П., Девяткова Н.С., Синельникова И.А., Шевцов И.Д., Ошевенский Л.В., Крылов В.Н., Федотов В.Д., Маслов А.Г. Патент РФ № 2432972(13) С1 МПК А 61N 2/00, бюл. № 31, 2011. [Sposob korrektsii funkcionalnogo sostojaniya organizma [Method of correction of functional state of the organism]. Lobkaeva Ye.P., Devjatkova N.S., Sinel'nikova I.A., Shevtsov I.D., Oshevskii L.V., Krylov V.D., Fedotov V.D., Maslov A.G. Patent of RF No. 2432972(13) С1 МПК А 61N 2/00, bull. No. 31. 2011. (In Russian).
 15. Сысоева И.В. Современное представление о биологическом действии магнитных полей и их применение в медицине. *Медицинские новости*. 2005;4:21–28. [Sysoeva I.V. Sovremennoe predstavleniye o biologicheskom dejstvii magnitnykh polej i ih primeneniye v medicine [Modern understanding of the biological effect of magnetic fields and their application in medicine]. *Medicinskie novosti [Medical news]*. 2005;(4):21–28. (In Russian)].

16. Улащик В.С. *Физиотерапия: Универсальная медицинская энциклопедия*. Минск: Книжный дом, 2008:640. [Ulashchik V.S. *Physiotherapy: Universal Medical Encyclopedia*. Minsk: Knizhnyi dom Publ., 2008:640. (In Russian)].
17. Федотов В.Д. Возможности коррекции вегетативной дисрегуляции у пациентов с эссенциальной артериальной гипертензией. *Врач-аспирант*. 2011;47(4.4):596–600. [Fedotov V.D. *Vozmozhnosti korektsii vegetativnoj dizregulyatsii u patsientov s essentsial'noj arterial'noj gipertenziej* [The possibilities of correction of vegetative disregulation in patients with essential arterial hypertension]. *Vrach-aspirant [Doctor-graduate student]*. 2011;47(4.4):596–600. (In Russian)].
18. Харамоненко С.С., Ракитянская А.А. *Электрофорез клеток крови в норме и патологии*. Минск: Белорусь, 1974:144. [Haramonenko S.S., Rakityanskaya A.A. *Elektroforez kletok krvi v norme i patologii* [Electrophoresis of blood cells in normal and pathological conditions]. Minsk: Belorus' Publ., 1974:144. (In Russian)].
19. Koch C.L.M.B., Sommarin M., Persson B.R.R., et al. Interaction between weak low frequency magnetic fields and cell membranes. *Bioelectromagnetics*. 2003;24:395–402. DOI: 10.1002/bem.10136.
20. Martusevich A.K., Martusevich A.A., Kovaleva L.K. Biocrystallomics Methods in Estimation of the Action of Different Stress Factors. *Journal of Stress Physiology&Biochemistry*. 2016;12(3):12–17.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Ананьева Юлия Евгеньевна*, ФГУП «Российский федеральный ядерный центр — Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной физики»;
e-mail: anyue@mail.ru

Захарова Ольга Анатольевна, к.б.н., ФГУП «Российский федеральный ядерный центр — Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной физики»;
e-mail: olga@bfrc.vniief.ru

Федотов Василий Дмитриевич, к.м.н., доц., ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России

Лабынцева Ольга Михайловна, к.б.н., ФГУП «Российский Федеральный ядерный центр — Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной физики»;
e-mail: olga@bfrc.vniief.ru

Yuliya E. Ananieva*, Russian Federal Nuclear Center — Russian Federal Nuclear Center — All-Russian Research Institute of Experimental Physics;
e-mail: anyue@mail.ru

Olga A. Zakharova, Cand. Sci. (Biol.), Russian Federal Nuclear Center — Russian Federal Nuclear Center — All-Russian Research Institute of Experimental Physics;
e-mail: olga@bfrc.vniief.ru

Vasiliy D. Fedotov, Cand. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Volga Research Medical University of the Ministry of Health Care of Russia

Olga M. Labyntseva, Cand. Sci. (Biol.), Russian Federal Nuclear Center — Russian Federal Nuclear Center — All-Russian Research Institute of Experimental Physics;
e-mail: olga@bfrc.vniief.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author



СРАВНЕНИЕ ИММУНОГЕННОСТИ ВАКЦИНЫ «ГАМ-КОВИД-ВАК» ПРИ ВНУТРИМЫШЕЧНОМ И ИНТРАНАЗАЛЬНОМ ПУТЯХ ВВЕДЕНИЯ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Е.И. Каторкина, И.В. Лягоскин, Е.Н. Бочарова, М.В. Болотникова, А.А. Борзов,
Н.В. Бельская*, А.Е. Лисова, К.В. Ульянова, Н.К. Кудина, Н.А. Белянина,
О.М. Стрижакова, А.С. Першин, Я.А. Бахарева, П.Е. Каргополова, А.П. Васильев,
А.А. Казаров, М.В. Лыков, Р.А. Хамитов

АО «ГЕНЕРИУМ»
601125, Российская Федерация, Владимирская обл.,
Петушинский р-н, п. Вольгинский, Владимирская ул., 14Б

Представлены результаты сравнительного исследования иммуногенности двухкомпонентной вакцины «Гам-КОВИД-Вак» производства АО «ГЕНЕРИУМ» (Россия) при разных путях введения мышам линии BALB/c (после введения первого или обоих компонентов). Об иммуногенности судили по изменению уровня антигенспецифических антител IgG и IgA в крови и бронхоальвеолярной жидкости, количеству Т-лимфоцитов, вырабатывающих IFN- γ при антигенной стимуляции, количеству антигенспецифических IFN- γ -продуцирующих CD4 и CD8 Т-лимфоцитов. Исследование показало, что интраназальное введение индуцировало развитие мукозального иммунитета, значительно превосходя качественно и количественно эффект внутримышечного введения (по количеству животных с антигенспецифическими антителами IgA и титру антител в сыворотке крови и бронхоальвеолярном лаваже); в то время как внутримышечное несколько превосходило эффект, полученный при интраназальном введении, по влиянию на общее количество продуцирующих IFN- γ CD8-лимфоцитов.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, векторная вакцина, мукозальный иммунитет, иммуногенность

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Каторкина Е.И., Лягоскин И.В., Бочарова Е.Н., Болотникова М.В., Борзов А.А., Бельская Н.В., Лисова А.Е., Ульянова К.В., Кудина Н.К., Белянина Н.А., Стрижакова О.М., Першин А.С., Бахарева Я.А., Каргополова П.Е., Васильев А.П., Казаров А.А., Лыков М.В., Хамитов Р.А. Сравнение иммуногенности вакцины «Гам-КОВИД-Вак» при внутримышечном и интраназальном путях введения в эксперименте. *Биомедицина*. 2023;19(4):56–69. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-19-4-56-69>

Поступила 05.04.2023

Принята после доработки 15.07.2023

Опубликована 10.12.2023

COMPARATIVE IMMUNOGENICITY OF THE GAM-COVID-VAC VACCINE UNDER INTRANASAL AND INTRAMUSCULAR ADMINISTRATION

Elena I. Katorkina, Ivan V. Lyagoskin, Eugenia N. Bocharova, Maria V. Bolotnikova,
Anton A. Borzov, Nataliya V. Belskaya*, Alena E. Lisova, Ksenia V. Ulyanova,
Nataliya K. Kudina, Natalia A. Belyanina, Olga M. Strizhakova, Andrey S. Pershin,
Yana A. Bahareva, Polina E. Kargopolova, Aleksander P. Vasiliev, Aleksander A. Kazarov,
Maksim V. Lykov, Ravil A. Khamitov

GENERIUM

601125, Russian Federation, Vladimir Region, Petushinskiy District,
Vol'ginskiy Village, Vladimirskaya Str., 14B

In this work, we set out to compare the immunogenicity of the Gam-COVID-Vac two-component vaccine produced by GENERIUM JSC (Russia) following its intranasal or intramuscular administration of the first or both components to BALB/c mice. The immunogenicity was evaluated according to antigen-specific IgG and IgA antibodies in the blood and bronchoalveolar fluid, the number of antigen-specific IFN- γ -producing T-lymphocytes, the number of antigen-specific IFN- γ -producing CD4 and CD8 T-lymphocytes. Intranasal administration was shown to induce the mucosal immunity, significantly exceeding both qualitatively and quantitatively the effect of intramuscular administration (by the number of animals with antigen-specific IgA antibodies and the titer of antibodies in blood serum and bronchoalveolar lavage). At the same time, intramuscular administration slightly exceeded the effect obtained under intranasal administration in terms of the total number of CD8-IFN- γ -producing lymphocytes.

Keywords: SARS-CoV-2, vector vaccine, mucosal immunity, immunogenicity

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

For citation: Katorkina E.I., Lyagoskin I.V., Bocharova E.N., Bolotnikova M.V., Borzov A.A., Belskaya N.V., Lisova A.E., Ulyanova K.V., Kudina N.K., Belyanina N.A., Strizhakova O.M., Pershin A.S., Bahareva Ya.A., Kargopolova P.E., Vasiliev A.P., Kazarov A.A., Lykov M.V., Khamitov R.A. Comparative Immunogenicity of the Gam-COVID-Vac Vaccine under Intranasal and Intramuscular Administration. *Journal Biomed.* 2023;19(4):56–69. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-19-4-56-69>

Submitted 05.04.2023

Revised 15.07.2023

Published 10.12.2023

Введение

Человеческие аденовирусы являются очень удобным инструментом в качестве вектора для генной и онколитической терапии, а также для вакцинации [4]. На основе двух типов рекомбинантных аденовирусов (26 серотип — rAd26 и 5 серотип — rAd5), несущих ген S-белка (гликопротеина) вируса SARS-CoV-2 (входит в состав поверхностных молекул вирусной частицы), была разработана «Гам-КОВИД-Вак» (Gam-COVID-Vac, ATX — J07BX03) для профилактики заболевания, вызываемого вирусом SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2). Оба серотипа аденовируса не способны к репликации. Применение вакцины предполагает поочередное введение компонента-1 (содержит rAd26), спустя 3 недели — компонента-2 (содержит rAd5). Такой режим введения обозначен термином «гетерологический прайм-буст». Использование двух серотипов позволяет увеличить диапазон ми-

шеней и уменьшить вероятность нежелательного иммунного ответа на векторную составляющую (который снижает эффективность вакцинации), а режим прайм-буст увеличивает интенсивность и длительность возникающего иммунитета, как показано в случае вакцин против гриппа [7, 8].

Многолетний опыт вакцинации показывает, что путь введения определяет в значительной степени эффективность развивающегося иммунитета: так, пероральная иммунизация обычно стимулирует иммунные реакции в желудочно-кишечном тракте, слизистой оболочке полости рта и носоглоточной лимфоидной ткани, а интраназальная — эффективно индуцирует выработку антител в слюнных железах, лимфоидной ткани, локализованной в носоглоточной области и нижних дыхательных путях [10]. Учитывая, что входными воротами для вируса SARS-CoV-2 являются верхние дыхательные пути, представлялось целесообразным попытаться

использовать ее и для мукозальной иммунизации. Кроме того, замена инъекционной иммунизации на мукозальную позволяет решать ряд проблем: снизить дискомфорт у детей за счет исключения болевого стресса, уменьшить экономические и трудовые затраты при расширении масштабов вакцинопрофилактики, особенно тогда, когда она требуется в ограниченные сроки для больших контингентов [1].

Целью данной работы было оценить иммуногенность вакцины «Гам-КОВИД-Вак» при интраназальном пути введения мышам в сравнении с внутримышечным.

Материалы и методы

Вакцина. Оба компонента представляли собой однородный бесцветный слегка опалесцирующий раствор (рН=7,4), содержащий рекомбинантные аденовирусные частицы с геном гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (компонент-1 — аденовирусные частицы 26 серотипа, компонент-2 — аденовирусные частицы 5 серотипа, концентрация вирусных частиц $2,0 \times 10^9$ /мл) производства АО «ГЕНЕРИУМ» (Россия). В качестве негативного контроля использовали р-р вспомогательных веществ (рН=7,4) производства АО «ГЕНЕРИУМ» (Россия).

Животные. В экспериментах использованы мыши (самки) SPF-статуса линии BALB/c (производитель: “Taconic Biosciences, Inc.”, США) в возрасте 14 недель на начало исследования. Данная линия обладает высоким уровнем иммунологической реактивности к антигенам вируса SARS-CoV-2 [9, 12]. Условия содержания и использования животных были рассмотрены и одобрены Комиссией по биоэтике АО «ГЕНЕРИУМ». После поступления животные проходили адаптацию в течение 7 дней, во время которой и затем в исследовании их содержали группами в индивидуально вентилируемых клетках, обеспечивая стабиль-

ные параметры микроклимата (температура 22–24°C, влажность 40–60%) при световом режиме дня и ночи 12:12, при свободном доступе к корму и воде. Корм «ЧАРА» для разведения лабораторных животных SPF-категории (ООО «Ассортимент Агро», Россия) и «ВАКА» (ООО «БИОСФЕРА», Россия) перед раздачей автоклавировали. Для поения животных использовали воду, прошедшую подготовку в обратно-осмотической установке (RiOs 100 High Fouling, “Millipore”, Франция) и разлитую в автоклавированные бутылочки. Подстил состоял из смеси 1:4 подстила «Золотой Кот» (производства ООО «ЗКК «Золотой Початок», Россия) и SAFE (производства “J. Rettenmaier&Sohne GmbH+CO”, Германия), перед использованием его автоклавировали. Групповую идентификацию осуществляли при помощи карточек-этикеток, индивидуальную — нанесением меток на ушную раковину. Эвтаназию проводили с использованием двуокси углерода.

Дизайн исследования. Формировали 8 групп животных (табл. 1) массой тела 21,4–24,2 г (min — max). Животные групп 1–4 получали плацебо (Пл) или компонент-1 вакцины (ВК1) однократно: группы 1 и 2 получали плацебо (Пл1), группы 3 и 4 — компонент-1 вакцины (ВК1). Вещества вводили внутримышечно (в/м) группам 1 и 3, интраназально (и/н) — группам 2 и 4. Мыши групп 5–8 получали вещества 2 раза: группы 5 и 6 — плацебо (Пл2), группы 7 и 8 — сначала ВК1, через 21 сут — компонент-2 вакцины (ВК2). Путь введения для групп 5 и 7 был в/м, для групп 6 и 8 — и/н. День первого введения считался нулевыми сутками эксперимента.

Отбор образцов (кровь, бронхоальвеолярная жидкость (БАЛ) и селезенка) проводили у животных групп 1–4 на 21-е сут, у групп 5–8 — на 42-е сут. В сыворотке крови и в БАЛ определяли титр антител IgG и IgA, специфичных к пептидам, входящим в структуру S гликопротеина ви-

Таблица 1. Распределение животных по группам

Table 1. Distribution of animals by groups

Группа	Вводимое вещество	Путь и объем введения	Количество и пол животных	Сутки отбора образцов
1	Пл1	в/м 50 мкл	10 ♀	21
2	Пл1	и/н 50 мкл	10 ♀	21
3	ВК1	в/м 50 мкл	10 ♀	21
4	ВК1	и/н 50 мкл	10 ♀	21
5	Пл2	в/м 50 мкл	10 ♀	42
6	Пл2	и/н 50 мкл	10 ♀	42
7	ВК1+ВК2	в/м 50 мкл	10 ♀	42
8	ВК1+ВК2	и/н 50 мкл	10 ♀	42

руса SARS-CoV-2 (анти-S-IgG и анти-S-IgA). В селезенке оценивали количество Т-клеток, продуцирующих IFN- γ при стимуляции пептидами S гликопротеина вируса SARS-CoV-2 (антигенспецифические Т-IFN- γ), количество CD4-позитивных и CD8-позитивных Т-лимфоцитов, продуцирующих IFN- γ в ответ на пептиды гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (антигенспецифические CD4-IFN- γ и CD8-IFN- γ). Наблюдение за животными на предмет общего состояния и смертности осуществляли ежедневно, клинический осмотр животных проводили до введения, через 24 ч после введения и перед эвтаназией на 21-е и 42-е сут. Всех павших животных подвергали некропсии и гистологическому исследованию органов с выявленными макроскопически изменениями. Согласно стандартной операционной процедуре в ходе клинического осмотра оценивали упитанность, состояние шерсти и кожного покрова, наличие выделений из естественных отверстий, активность, потребление корма/воды, состояние фекалий, реакцию на руки, тургор кожи, состояние видимых слизистых оболочек, наличие аномалий зубов. Животных взвешивали накануне введения и перед эвтаназией. Об иммуногенности вакцины судили по изменению уровня антигенспецифических антител IgG и IgA в крови и бронхоальвеолярной жидкости, количеству Т-лимфоцитов, вырабатывающих IFN- γ при антигенной стимуляции, количеству антигенспеци-

ческих IFN- γ -продуцирующих CD4 и CD8 Т-лимфоцитов.

Введение вакцины. Вакцину (компонент-1 — ВК1 и компонент-2 — ВК2) вводили в дозе $1,0 \times 10^8$ вирусных частиц каждому животному в объеме 50 мкл, плацебо (Пл) вводили в том же объеме один (Пл1) или два раза (Пл2). Инъекцию проводили в мышцу бедра, при интраназальном пути введения — по 25 мкл в каждую ноздрю.

Отбор и подготовка проб крови, БАЛ и селезенки. Отбор крови проводили после эвтаназии торакотомией в пробирки с активатором свертывания, отделяли сыворотку центрифугированием (1000 об./мин, 5 мин, 20°C), разливали сыворотку на 3 аликвоты и хранили до проведения анализа при температуре не выше -50°C. После отбора крови животное фиксировали на препаровальном столике, последовательно выполняли разрезы кожи, подкожной клетчатки, поверхностных фасций от нижнегрудинной области до верхнего отдела шеи, сепарировали мышцы, выделяли трахею. Проводили под трахею лигатуру и делали микроразрез, вводили в него иглу и затягивали лигатуру. Затем медленно вводили 0,5 мл стерильного физ. р-ра для инфузий, отбирали жидкость и переносили ее в пробирки. Процедуру введения и забора раствора повторяли дважды. Полученную БАЛ центрифугировали (2300 об./мин 10 мин при 20°C), надсадочную жидкость переносили в стерильные пробирки и до анализа хранили при темпе-

ратуре не выше -70°C . Селезенку выделяли и помещали в чашки Петри со стерильным изотоническим фосфатно-солевым буферным р-ром, удаляли капсулу и жир, гомогенизировали, процеживали полученные суспензии через фильтр для клеток ("Falcon® 70 μm Cell Strainer Corning Inc.", США) и осаждали клетки центрифугированием (1200 об./мин, 5 мин). Супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в среде для криоконсервации и разливали по пробиркам. Пробирки хранили до анализа при температуре не выше -152°C .

Выявление антител классов IgA и IgG, специфичных к гликопротеину S вируса SARS-CoV-2, и определение их титра. Использовали методы непрямого иммуноферментного анализа, которые предварительно были валидированы в соответствии с работами [6, 11]. В качестве носителя антигена использовали готовые планшеты с иммобилизованным гликопротеином S из набора реагентов «SARS-CoV-2-RBD-ИФА-Гамалеи» (Филиал «Медгамал» ФГБУ «НИЦЭМ им. Гамалеи» Минздрава России, Россия). В лунки планшета вносили по 100 мкл сыворотки или БАЛ (в виде серии разведений от 1/100), инкубировали 1 ч в шейкере-термостате (скорость вращения 250 об./мин, 37°C), трижды промывали буферным р-ром, вносили антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (поликлональные козы антитела к мышьяным IgA или IgG производства "Abscam", Великобритания), инкубировали в шейкере-термостате 1 ч (скорость вращения 250 об./мин, 37°C), трижды промывали. Вносили по 100 мкл хромогенного субстрата к пероксидазе хрена, инкубировали 5 мин при комнатной температуре до развития голубой окраски. Реакцию останавливали добавлением 0,5 М р-ра H_2SO_4 и измеряли оптическую плотность (ОП) фотометром Microplate Manager® 6 (xMark, "Bio-Rad", США) при длине волны 450 нм.

При выявлении антител определяли их титр, для чего рассчитывали нормированный коэффициент в каждом разведении как соотношение ОП образца к ОП буферного р-ра. Титр антител определяли по формуле:

$$\text{Титр} = R_H + \left(\frac{(\bar{K}_H - 2,0) \times (R_L - R_H)}{(\bar{K}_H - \bar{K}_L)} \right),$$

где R_H — максимальный коэффициент разведения исследуемого образца (ИО), нормированный коэффициент которого выше предельного значения; K_H — нормированный коэффициент для ИО с максимальным разведением, превышающим предельное значение; K_L — нормированный коэффициент для исследуемого образца с минимальным разведением ниже предельного значения; R_L — минимальный коэффициент разведения ИО, нормированный коэффициент которого ниже предельного значения; R_H — максимальный коэффициент разведения ИО, нормированный коэффициент которого выше предельного значения; 2,0 — предельное значение нормированного коэффициента, оцененное при валидации метода.

Определение количества Т-лимфоцитов, продуцирующих IFN- γ при стимуляции антигеном. Использовали набор Mouse IFN- γ ELISpot PLUS Kit ("MABTECH", Швеция) и метод ELISpot, предварительно валидированный в соответствии с работой [6]. Суспензию спленоцитов после разморозки и отмывки переводили в питательную среду DMEM/F12 ("Sigma Aldrich", США) с 10% фетальной бычьей сывороткой ("HyClone", США) с концентрацией $3,0 \times 10^6$ кл/мл. В лунки 96-луночного плоскостонного планшета из коммерческого набора, покрытые антителами к IFN- γ мыши, вносили по 100 мкл суспензии спленоцитов каждого животного и S-белок SARS-CoV-2 (АО «ГЕНЕРИУМ», Россия), в лунках негативного контроля присутствовали только спленоциты, в лун-

ки позитивного контроля к спленоцитам добавляли 10 мг/мл конканавалина А (ООО НПП «ПанЭко», Россия). Инкубировали 12–48 ч (37°C, 5% CO₂, влажность 95%), затем лунки промывали, вносили детектирующие биотинилированные антитела, инкубировали 2 ч при комнатной температуре. После отмывки вносили р-р стрептовидина, конъюгированного с щелочной фосфатазой, и оставляли на 1 ч при комнатной температуре. После отмывки вносили р-р субстрата, инкубировали в темном месте при комнатной температуре 10–30 мин до появления отчетливо видимых пятен в позитивном контроле. Окрашенные пятна подсчитывали с помощью AID Classic ELISpot Reader (“AID GmbH”, Германия), из количества пятен в лунках с антигеном (S-белок вируса SARS-CoV-2) вычитали количество пятен в лунках со средой (негативный контроль).

Определение антигенспецифических IFN-γ-продуцирующих CD8+ и CD4+ Т-лимфоцитов. Методика была предварительно валидирована в соответствии с работой [6]. Суспензию спленоцитов после разморозки и отмывки переводили в питательную среду DMEM/F12 (“Sigma Aldrich”, США) с 10% фетальной бычьей сывороткой (“HyClone”, США) с концентрацией клеток 5,0×10⁶/мл. В лунки 96-луночного круглодонного планшета (“Corning”, США) вносили по 100 мкл суспензии спленоцитов каждой мыши и S-белок SARS-CoV-2 (АО «ГЕНЕРИУМ», Россия), в лунках негативного контроля присутствовали только спленоциты, в лунки позитивного контроля кроме спленоцитов добавляли 10 мкг/мл конканавалина А (ООО НПП «ПанЭко», Россия). Инкубировали 24±1 ч (37°C, 5% CO₂, влажность 95%), затем добавляли р-р ингибитора транспорта белка, содержащего брэфельдин А (“BD Biosciences”), инкубировали в тех же условиях еще 4 ч. Клетки отмывали, ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере, добавляли реагент для определения жизнеспособных клеток

Fixable Viability Stain 510 (“BD Biosciences”), инкубировали 7±2 мин при 37°C, отмывали и добавляли р-р Fc Block (“BD Biosciences”). Затем в лунки вносили реагенты для иммунофенотипирования (все — производства “BD Biosciences”): крысиные антитела против CD3 мыши, конъюгированные с PerCP-Cy™ 5.5 Клон 17A2, против CD4 мыши, конъюгированные с PE Клон RM4-5, против CD8 мыши, конъюгированные с BV515, Клон 53-6,7. Планшет инкубировали в темноте 30 мин (5°C), отмывали, осадок каждой лунки ресуспендировали в 100 мкл р-ра для фиксации Fixation Buffer (“BD Biosciences”), инкубировали в течение 20 мин (5°C), клетки отмывали р-ром для пермеабилзации и отмывки Perm/Wash (“BD Biosciences”) и ресуспендировали в 100 мкл этого же раствора, инкубировали 20 мин (5°C), отмывали, ресуспендировали в 50 мкл этого же раствора и добавляли крысиные антитела против IFN-γ мыши, конъюгированные с BV421, клон XMG1.2 (“BD Biosciences”). Инкубировали 30 мин в темноте (5°C), отмывали и ресуспендировали р-ром для пермеабилзации и отмывки Perm/Wash. Интенсивность флуоресценции измеряли на 3-лазерном проточном цитометре Canto II (“Becton Dickinson”, США). Использовали следующий порядок гейтирования: выделяли живые клетки, затем CD3+ популяцию, затем CD4+ и CD8+ клетки, в популяциях CD4+ или CD8+ Т-клеток выделяли клетки, позитивные по маркерам IFN-γ. Для достоверности получаемых данных в живых клетках собирали не менее 50000 событий. Данные обрабатывали с помощью программного обеспечения FlowJo 7.6.5 и MS Excel, GrafPad Prism 8.0. По результатам анализа рассчитывали среднее значение процентного содержания CD4+ и CD8+ Т-клеток по маркерам IFN-γ. Если коэффициент вариации (% CV) значений для каждого образца превышал 30%, то исследование повторялось.

Патоморфологическое исследование. Павших животных вскрывали, оценивали

состояние трупа (выделения из естественных отверстий, состояние кожи, брюшины), органы грудной клетки и брюшной полости, оболочки мозга и головной мозг; органы с выявленными макроскопически изменениями отбирали для приготовления гистологических препаратов и их последующего анализа. После фиксации формалиновым буфером образцы обезживали, заливали в парафин, изготавливали срезы толщиной 3–5 мкм, окрашивали гематоксилином-эозином и изучали с использованием микроскопа Leica DM4000.

Методы статистической обработки данных. Межгрупповое сравнение количества особей с антителами проводили с использованием χ^2 . Для сравнения групп по содержанию антител после логарифмической трансформации по основанию 10 оценили соответствие значений лог-титра нормальному распределению (по критерию Шапиро — Уилка), при нормальном распределении использовали двухфакторный дисперсионный анализ с последующим попарным сравнением методом Тьюки. Сравнение групп по содержанию CD4+ и CD8+ клеток проводили методом попарного межгруппового сравнения Сидака

(Šidák's test) и двухфакторным дисперсионным анализом (2-way ANOVA). Для определения статистических выбросов был использован критерий Граббса. Для вычислений и построения графиков использовали программу GraphPad Prism 8.0.

Результаты исследований

Состояние животных в период наблюдения. Клинические осмотры не выявили отклонений в состоянии здоровья. Масса тела животных мало изменялась в период наблюдения, различий между группами по динамике массы тела не было. В группах 6 (Пл2 и/н) и 7 (BK1+BK2 в/м) погибло по одному животному (на 35-е и 5-е сут соответственно). Макро- и микроскопических изменений, подтверждающих, что причиной гибели могло быть введенное вещество, не обнаружено.

Антитела классов IgA и IgG, специфичные к гликопротеину S вируса SARS-CoV-2. В группах, получавших плацебо, анти-S-IgG и анти-S-IgA не обнаружены как в сыворотке крови, так и в БАЛ (табл. 2).

Введение BK1+BK2 и/н вызывало появления анти-S-IgG и анти-S-IgA в сыворотке крови у большего количества животных,

Таблица 2. Количество животных с антителами IgA и IgG, специфичными к гликопротеину S вируса SARS-CoV-2, в сыворотке крови и БАЛ в группах, получавших плацебо одно- или двукратно (Пл1 или Пл2), вакцину (один BK1 или два компонента BK1+BK2) внутримышечно (в/м) или интраназально (и/н)

Table 2. The number of animals with IgA and IgG antibodies specific to the SARS-CoV-2 virus glycoprotein S in the blood serum and BAL in the groups receiving placebo once or twice (Pl1 or Pl2), the vaccine (VC1 or VC1+VC2) intramuscularly (i/m) or intranasally (i/n)

Группа	Анти-S-IgA		Анти-S-IgG	
	сыворотка	БАЛ	сыворотка	БАЛ
1 (Пл1 в/м) n=10	0	0	0	0
2 (Пл1 и/н) n=10	0	0	0	0
3 (BK1 в/м) n=10	3	0	3	0
4 (BK1 и/н) n=10	8	0	10	0
5 (Пл2 в/м) n=10	0	0	0	0
6 (Пл2 и/н) n=9	0	0	0	0
7 (BK1+BK2 в/м) n=9	1	0	9	9
8 (BK1+BK2 и/н) n=10	10 ^a	4	10 ^a	8

Примечание: а — различия с группой 7 статистически значимы (χ^2 , $p < 0,0001$).

Note: a — differences with group 7 are statistically significant (χ^2 , $p < 0,0001$).

чем внутримышечное. Титр в сыворотке крови анти-S-IgA был выше при и/н введении в группах ВК1 и ВК1+ВК2, чем при в/м: в группе 3 у всех мышей составил менее 1:100, в группе 4 у шести мышей был меньше или равен 1:100, по одному животному имело титр 1:113 и 1:164; в группе 7 у одного животного титр ниже 1:100, в группе 8 титр в среднем составлял около 1:755 (min 1:100, max 1:1833). Титр анти-S-IgA в БАЛ в группе 4 в среднем составлял 1:380 (min 1:100, max 1:838). По лог-титру анти-S-IgA в сыворотке крови группа 4 статистически значимо превосходила группу 3 (Р-значение для попарного сравнения с поправкой Тьюки < 0,0001).

ВК1, вне зависимости от пути введения, менее эффективно стимулировало появление анти-S-IgG в сыворотке крови (рис. 1А) и БАЛ животных (рис. 1Б), чем введение ВК1+ВК2. Интраназальное введение ВК1

в большей степени стимулировало появление анти-S-IgG в сыворотке крови, чем внутримышечное, при введении ВК1+ВК2 эффективность стимуляции анти-S-IgG была сопоставима после в/м или и/н введения.

Количество Т-лимфоцитов, продуцирующих IFN-γ при антигенной стимуляции. Количество темно-фиолетовых пятен в лунке, соответствующее количеству Т-лимфоцитов, секретирующих IFN-γ в ответ на стимуляцию пептидами гликопротеина S вируса SARS-CoV-2, оценивали в двух повторностях. Из полученных усредненных значений вычитали количество пятен в отрицательном контроле (спленциты в среде), получив нормированное число пятен. В группах, которым вводили плацебо, нормированное число пятен не превышало 6,5 и в большинстве случаев находилось в интервале от -2,0 до 2,5. Не обнаружено статистически значимых различий между

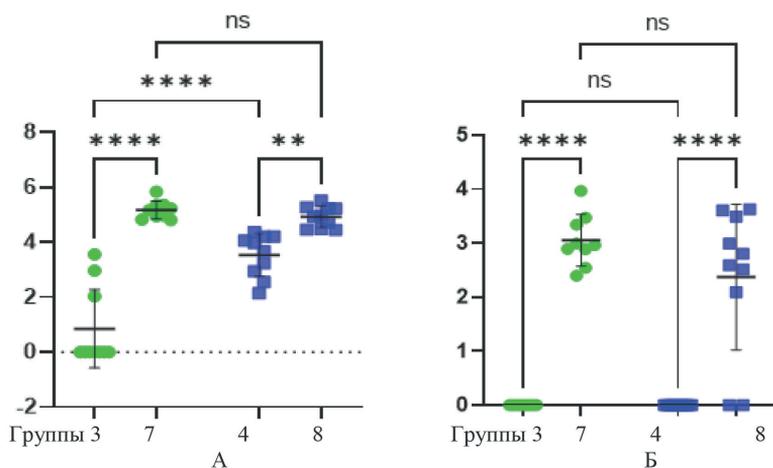


Рис. 1. Сравнение уровня антител класса IgG, специфичных к гликопротеину S вируса SARS-CoV-2 (лог-титр), в сыворотке крови животных (А) и в БАЛ (Б) в группах 3 (ВК1 в/м), 7 (ВК1+ВК2 в/м), 4 (ВК1 и/н) и 8 (ВК1+ВК2 и/н).

Примечание: зеленым цветом обозначены группы, получавшие вакцину внутримышечно (в/м), синим — интраназально (и/н); ns означает отсутствие статистически значимых различий, ** или **** — наличие различий (попарное межгрупповое сравнение методом Тьюки, Р-значение с поправкой Тьюки < 0,0001).

Fig. 1. Comparison of the level of IgG antibodies specific to the SARS-CoV-2 virus glycoprotein S (log titer) in the blood serum of animals (A) and BAL (B) in groups 3 (BK1 i/m), 7 (BK1+BK2 i/m), 4 (BK1 i/n) and 8 (BK1+BK2 i/n).

Note: green indicates groups that received the vaccine intramuscularly (i/m), blue — intranasally (i/n); ns means no statistically significant differences, ** or **** — the presence of differences (pairwise intergroup comparison by the Tukey method, P-value with Tukey correction < 0.0001).

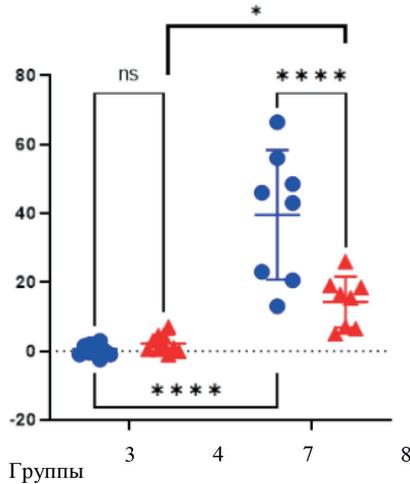


Рис. 2. Сравнение количества Т-лимфоцитов, продуцирующих IFN- γ в ответ на стимуляцию гликопротеином S вируса SARS-CoV-2 (нормированное число пятен), в клетках, выделенных из селезенки животных групп 3 (BK1 в/м), 4 (BK1 и/н), 7 (BK1+BK2 в/м) и 8 (BK1+BK2 и/н).

Примечание: синим цветом обозначены группы, получавшие вакцину внутримышечно (в/м), красным — интраназально (и/н); ns означает отсутствие статистически значимых различий, * или **** — наличие различий (парное межгрупповое сравнение методом Сидака, P-значение с поправкой Сидака < 0,0001).

Fig. 2. Comparison of the number of T-lymphocytes producing IFN- γ in response to stimulation by glycoprotein S of the SARS-CoV-2 virus (normalized number of spots) in the spleen of animals of group 3 (BK1 i/m), 4 (BK1 i/n), 7 (BK1+BK2 i/m) and 8 (BK1+BK2 i/n).

Note: the blue color indicates the groups that received the vaccine intramuscularly (i/m), red — intranasally (i/n); ns means no statistically significant differences, * or **** — the presence of differences (pairwise intergroup comparison by Sidak method, P-value with Sidak correction < 0.0001).

группами 1 (Пл1 в/м) и 3 (BK1 в/м), 2 (Пл1 и/н) и 4 (BK1 и/н).

BK1, вне зависимости от пути введения, не приводило к повышению количества антигенспецифических Т-IFN- γ в селезенке мышей (рис. 2). Введение BK1+BK2 вызывало увеличение популяции антигенспецифических Т-IFN- γ , при этом эффект от внутримышечного введения превосходил таковой при интраназальном введении.

Количество антигенспецифических IFN- γ -продуцирующих CD4 и CD8 Т-лимфоцитов. Введение BK1 в/м или и/н (табл. 3) не приводило к повышению количества антигенспецифических CD4-IFN- γ , но увеличивало вдвое популяцию CD8-IFN- γ . Введение BK1+BK2 вызывало увеличение количества как CD4-IFN- γ , так и CD8-IFN- γ . Изменение в размере популяций CD4-IFN- γ и CD8-IFN- γ после введе-

ния BK1 или BK1+BK2 не зависело от пути введения.

По влиянию на размер популяции антигенспецифических CD4-IFN- γ (рис. 3) введение BK1 в/м или и/н между собой не различались. Введение BK1+BK2 в/м приводило к большему увеличению популяции антигенспецифических CD8-IFN- γ , чем и/н введение.

Обсуждение результатов

Выявление антител, специфичных к гликопротеину S вируса SARS-CoV-2 в ответ на введение вакцины, показало, что и/н способ введения в сравнении с в/м значительно сильнее стимулирует выработку антител (анти-S-IgG и анти-S-IgA). Это различие в первую очередь проявляется в значимом увеличении количества животных с анти-

Таблица 3. Количество CD4 и CD8 позитивных T-лимфоцитов (в % от всех CD3-позитивных клеток), продуцирующих IFN-γ в ответ на стимуляцию гликопротеином S вируса SARS-CoV-2, в селезенке животных, получавших плацебо одно- или двукратно (Пл1 или Пл2), вакцину (один ВК1 или два компонента ВК1+ВК2) внутримышечно (в/м) или интраназально (и/н) (Mean±SD)

Table 3. The number of CD4 and CD8 positive T-lymphocytes (in % of all CD3-positive cells) producing IFN-γ in response to stimulation by glycoprotein S of the SARS-CoV-2 in the spleen of animals receiving placebo once or twice (Пл1 or Пл2), the vaccine (BK1 or BK1+BK2) intramuscularly (i/m) or intranasally (i/n) (Mean±SD)

Группа	CD4-IFN-γ (%)	CD8-IFN-γ (%)
1 (Пл1 в/м) n=10	0,06±0,02	0,09±0,02
2 (Пл1 и/н) n=10	0,07±0,01	0,07±0,02
3 (BK1 в/м) n=10	0,08±0,04	0,20±0,07 ^a
4 (BK1 и/н) n=10	0,09±0,02	0,17±0,07 ^b
5 (Пл2 в/м) n=10	0,06±0,02	0,08±0,02
6 (Пл2 и/н) n=9	0,06±0,01	0,07±0,02
7 (BK1+BK2 в/м) n=9	0,15±0,06 ^a	0,59±0,27 ^a
8 (BK1+BK2 и/н) n=10	0,13±0,04 ^c	0,30±0,12 ^c

Примечание: различия статистически значимы (2-way ANOVA, $p < 0,0001$): ^a — с группой 1; ^b — с группой 2; ^c — с группой 3; ^d — с группой 4.

Note: the differences are statistically significant (2-way ANOVA, $p < 0,0001$): ^a — with group 1; ^b — with group 2; ^c — with group 3; ^d — with group 4.

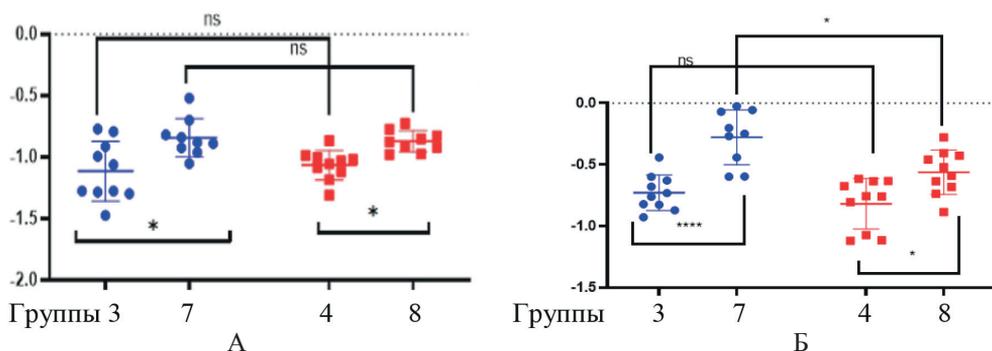


Рис. 3. Сравнение количества CD4 (А) и CD8 (Б) позитивных T-лимфоцитов, продуцирующих IFN-γ в ответ на стимуляцию гликопротеином S вируса SARS-CoV-2 (логарифм процент), в селезенке животных групп 3 (BK1 в/м), 4 (BK1 и/н), 7 (BK1+BK2 в/м), и 8 (BK1+BK2 и/н).

Примечание: синим цветом обозначены группы, получавшие вакцину внутримышечно (в/м), красным — интраназально (и/н); ns означает отсутствие статистически значимых различий, * — наличие различий (парное межгрупповое сравнение методом Сидака, P-значение с поправкой Сидака $< 0,0001$).

Fig. 3. Comparison of the number of CD4 (A) and CD8 (B) positive T-lymphocytes producing IFN-γ in response to stimulation by glycoprotein S of the SARS-CoV-2 (logarithm percentage) in the spleen of animals of groups 3 (BK1 i/m), 4 (BK1 i/n), 7 (BK1+BK2 i/m), and 8 (BK1+BK2 i/n).

Note: the blue color indicates the groups that received the vaccine intramuscularly (i/m), red — intranasally (i/n); ns means no statistically significant differences, * — the presence of differences (pairwise intergroup comparison by Sidak method, P-value with Sidak correction $< 0,0001$).

талами в сыворотке, но отчасти и в более высоком титре антител (табл. 2, рис. 1).

С другой стороны, введение обоих компонентов вакцины (BK1+BK2) в сравнении

с одним компонентом BK1 значительно повышает титр анти-S-IgG в сыворотке, хотя в отношении анти-S-IgA этот эффект не так заметен и проявляется только при и/н вве-

дении. Кроме того, только после введения второго компонента антитела появляются в БАЛ (анти-S-IgG — у большинства особей, анти-S-IgA — у отдельных животных и только при и/н введении).

Аналогичные результаты получены и другими авторами, которые показали, что исследуемая ими вакцина на основе аденовирусного вектора Ad5, несущего ген S белка SARS-CoV-2, при однократном и/н введении сильнее стимулировала мукозальный иммунитет (анти-S-IgA) у мышей линии BALB/c и хомячков, чем при в/м введении, но слабее стимулировала гуморальный ответ (анти-S-IgG) [14]. Подобные результаты получены и при и/н введении шимпанзе вакцины на основе аденовирусного вектора с геном S белка SARS-CoV-2: однократное и/н введение обеспечивало превосходный иммунитет против вируса SARS-CoV-2, в большей степени, чем одна или две в/м иммунизации той же дозой [5]. По данным [2], эффективность нескольких вариантов вакцин на основе аденовирусных векторов, несущих гены разных белков вируса SARS-CoV-2, длительность нахождения антител к разным белкам вируса была вдвое выше после и/н введения (антитела сохранялись в количестве 4-недельного уровня спустя еще 4 недели). Возможность при помощи вакцины вызвать появление мукозального иммунитета особенно важна, если иметь в виду, что у многих людей обнаруживается иммунитет к Ad5, развившийся до вакцинирования в результате предшествующей встречи с вирусом, что способно снижать эффективность вакцинации аденовекторной вакциной Ad5 [15]. В таком случае появление антигенспецифических IgA в секрете дыхательных путей после вакцинации способно предотвращать инфекцию или ослаблять ее течение.

Иммунизация одним компонентом вакцины (BK1), вне зависимости от пути введения, не приводила к повышению в селезенке общего количества Т-лимфоцитов,

продуцирующих IFN- γ в ответ на стимуляцию гликопротеином S вируса SARS-CoV-2, при этом в обеих группах (BK1 в/м и BK1 и/н) выявлено двукратное увеличение количества CD8-IFN- γ , но не CD4-IFN- γ (табл. 3). После введения второго компонента (BK2) наблюдалось значительное увеличение популяции антигенспецифических Т-IFN- γ , при этом эффект от в/м введения превосходил таковой при и/н (рис. 2). Увеличение количества Т-лимфоцитов в селезенке, продуцирующих IFN- γ в ответ на стимуляцию гликопротеином S вируса SARS-CoV-2, после введения BK2 происходило в основном за счет повышения доли CD8-IFN- γ , количество которых практически удваивалось по сравнению с введением только BK1 (табл. 3). По стимулирующему эффекту на клеточный иммунитет в/м введение превосходило и/н. Более сильное стимулирующее влияние на количество антигенспецифических CD8-IFN- γ , но не CD4-IFN- γ , в селезенке мышей после в/м пути введения в сравнении с и/н получено и другими авторами [3, 13]. Однако в исследовании [2] при оценке популяции антигенспецифических IFN- γ -продуцирующих клеток в БАЛ и лимфоидной ткани дыхательных путей показано, что и/н путь введения более эффективно стимулировал локализованный в дыхательных путях противовирусный иммунный ответ. Следует заметить, что для вирусов, вызывающих респираторные заболевания (в т.ч. SARS-CoV-2), иммунная система слизистой оболочки дыхательных путей является первой линией защиты, которая опосредована преимущественно антителами IgA, вырабатываемыми эпителиальными клетками слизистой оболочки. Поэтому и/н путь введения вакцины, вызывающий появление анти-S-IgA, представляется более предпочтительным, чем в/м.

Выводы

1. Интраназальный путь введения, в сравнении с внутримышечным, значительно сильнее стимулировал выработку антител классов IgG и IgA. Это различие в первую очередь проявлялось в значимом увеличении количества животных с антителами в сыворотке крови.

2. Введение двух компонентов вакцины, в сравнении с монотерапией компонентом 1, значимо повышало титр антител (в первую очередь IgG) в сыворотке крови. Кроме того, только после введения второго компонента антитела появлялись и в образцах бронхоальвеолярного лаважа.

3. Эффект интраназального введения компонента 1 вакцины по иммуногенно-

сти в отношении клеточного иммунитета мало отличался от эффекта, полученного при внутримышечном введении (по количеству Т-лимфоцитов, продуцирующих IFN- γ в ответ на стимуляцию гликопротеином S вируса SARS-CoV-2, по размеру популяций антигенспецифических CD4- и CD8-лимфоцитов, продуцирующих IFN- γ).

4. Введение обоих компонентов вакцины внутримышечно по влиянию на общее количество продуцируемых IFN- γ при стимуляции гликопротеином S вируса SARS-CoV-2 Т-лимфоцитов и размер популяции CD8-лимфоцитов превосходило эффект, полученный при интраназальном введении.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Семенов Б.Ф., Зверев В.В., Хаитов Р.М. Прогноз развития вакцинопрофилактики в первые десятилетия XXI века. *Педиатрическая фармакология*. 2009;6(5):96–106. [Semenov B.F., Zverev V.V., Khaitov R.M. Prognostic development of vaccine prevention in the first decades of the 21st century]. *Pediatric pharmacology*. 2009;6(5):96–106. (In Russian)].
2. Afkhami S., D'Agostino M.R., Zhang A., Stacey H.D., Marzok A., et al. Respiratory mucosal delivery of next-generation COVID-19 vaccine provides robust protection against both ancestral and variant strains of SARS-CoV-2. *Cell*. 2022;185:896–915. DOI: 10.1016/j.cell.2022.02.005.
3. Chavda V.P., Vora L.K., Pandya A.K., Patravale V.B. Intranasal vaccines for SARS-CoV-2: From challenges to potential in COVID-19 management. *Drug Discov. Today*. 2021;26(11):2619–2636. DOI: 10.1016/j.drudis.2021.07.021.
4. Gao J., Mese K., Bunz O., Ehrhardt A. State-of-the-art human adenovirus vectorology for therapeutic approaches. *FEBS Lett*. 2019;593(24):3609–3622. DOI: 10.1002/1873-3468.13691.
5. Hassan A.O., Kafai N.M., Dmitriev I.P., Fox J.M., Smith B.K., et al. A Single-dose intranasal ChAd vaccine protects upper and lower respiratory tracts against SARS-CoV-2. *Cell*. 2020;183(1):169–184.
6. Immunogenicity testing of therapeutic protein products — developing and validating assays for anti-drug antibody detection. Guidance for Industry. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM), 2019.
7. Khurana S., Coyle E.M., Dimitrova M., Castellino F., Nicholson K., et al. Heterologous prime-boost vaccination with MF59-adjuvanted H5 vaccines promotes antibody affinity maturation towards the hemagglutinin HA1 domain and broad H5N1 cross-clade neutralization. *PLoS One*. 2014;9(4):e95496. DOI: 10.1371/journal.pone.0095496.
8. Leroux-Roels I., Roman F., Forgue S., Maes C., De Boever F., et al. Priming with AS03 A-adjuvanted H5N1 influenza vaccine improves the kinetics, magnitude and durability of the immune response after a heterologous booster vaccination: an open non-randomised extension of a double-blind randomised primary study. *Vaccine*. 2010;28(3):849–857. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.10.017.
9. Lv H., Wu N.C., Tsang O.T. Yuan M., Perera R.A., et al. Cross-reactive antibody response between SARS-CoV-2 and SARS-CoV infections. *Cell Rep*. 2020;31(9):107725. DOI: 10.1016/j.celrep.2020.107725.
10. Miquel-Clopés A., Bentley E.G., Stewart J.P., Carding S.R. Mucosal vaccines and technology. *Clin. Exp. Immunol*. 2019;196(2):205–214. DOI: 10.1111/cei.13285.
11. Shankar G., Devanarayan V., Amaravadi L., Barrett Y.C., Bowsher R., et al. Recommendations for the validation of immunoassays used for detection of host antibodies against biotechnology products. *J. Pharm. Biomed. Anal*. 2008;48(5):1267–1281.
12. Smith T.R.F., Patel A., Ramos S., Dustin E., Zhu X., et al. Immunogenicity of a DNA vaccine candidate

- for COVID-19. *Nat. Commun.* 2020;11(1):2601. DOI: 10.1038/s41467-020-16505-0.
13. van der Ley P.A., Zariri A., van Riet E., Oosterhoff D., Kruiswijk C.P. An intranasal OMV-based vaccine induces high mucosal and systemic protecting immunity against a SARS-CoV-2 infection. *Front Immunol.* 2021;12:781280. DOI: 10.3389/fimmu.2021.781280.
14. Wu S., Zhong G., Zhang J., Shuai L., Zhang Z., et al. A single dose of an adenovirus-vectored vaccine provides protection against SARS-CoV-2 challenge. *Nat. Commun.* 2020;11(1):4081. DOI: 10.1038/s41467-020-17972-1.
15. Zhu F.-C., Li Y.-H., Guan X.-H., Hou L.-H., Wang W.-J., et al. Safety, tolerability, and immunogenicity of a recombinant adenovirus type-5 vectored COVID-19 vaccine: a dose-escalation, open-label, non-randomised, first-in-human trial. *Lancet.* 2020;395(10240):1845–1854. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)31208-3.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Каторкина Елена Ивановна, к.в.н.,
АО «ГЕНЕРИУМ»;
e-mail: katorkina@ibcgenerium.ru

Elena I. Katorkina, Cand. Sci. (Vet.), GENERIUM;
e-mail: katorkina@ibcgenerium.ru

Лягоскин Иван Владимирович, к.б.н.,
АО «ГЕНЕРИУМ»;
e-mail: lyagoskin@ibcgenerium.ru

Ivan V. Lyagoskin, Cand. Sci. (Biol.), GENERIUM;
e-mail: lyagoskin@ibcgenerium.ru

Бочарова Евгения Николаевна, к.б.н.,
АО «ГЕНЕРИУМ»;
e-mail: Varenik@ibcgenerium.ru

Eugenia N. Bocharova, Cand. Sci. (Biol.), GENERIUM;
e-mail: Varenik@ibcgenerium.ru

Болотникова Мария Валентиновна,
АО «ГЕНЕРИУМ»;
e-mail: bolotnikova@ibcgenerium.ru

Maria V. Bolotnikova, GENERIUM;
e-mail: bolotnikova@ibcgenerium.ru

Борзов Антон Александрович,
АО «ГЕНЕРИУМ»;
e-mail: borzov@ibcgenerium.ru

Anton A. Borzov, GENERIUM;
e-mail: borzov@ibcgenerium.ru

Бельская Наталия Витальевна*, д.м.н.,
АО «ГЕНЕРИУМ»;
e-mail: nvbelskaya@generium.ru

Nataliya V. Belskaya*, Dr. Sci. (Med.), GENERIUM;
e-mail: nvbelskaya@generium.ru

Лисова Алёна Евгеньевна, АО «ГЕНЕРИУМ»;
e-mail: aelisova@ibcgenerium.ru

Alena E. Lisova, GENERIUM;
e-mail: aelisova@ibcgenerium.ru

Ульянова Ксения Владимировна,
АО «ГЕНЕРИУМ»;
e-mail: ulyanova@ibcgenerium.ru

Ksenia V. Ulyanova, GENERIUM;
e-mail: ulyanova@ibcgenerium.ru

Кудина Наталья Константиновна,
АО «ГЕНЕРИУМ»;
e-mail: kudina@ibcgenerium.ru

Nataliya K. Kudina, GENERIUM;
e-mail: kudina@ibcgenerium.ru

Белянина Наталья Анатольевна,
АО «ГЕНЕРИУМ»;
e-mail: nabelyanina@ibcgenerium.ru

Natalia A. Belyanina, GENERIUM;
e-mail: nabelyanina@ibcgenerium.ru

Стрижакова Ольга Михайловна, к.в.н.,
АО «ГЕНЕРИУМ»;
e-mail: strizhakova@ibcgenerium.ru

Olga M. Strizhakova, Cand. Sci. (Vet.), GENERIUM;
e-mail: strizhakova@ibcgenerium.ru

Першин Андрей Сергеевич, к.в.н.,
АО «ГЕНЕРИУМ»;
e-mail: aspershin@generium.ru

Andrey S. Pershin, Cand. Sci. (Vet.), GENERIUM;
e-mail: aspershin@generium.ru

Бахарева Яна Алексеевна, АО «ГЕНЕРИУМ»;
e-mail: yabahareva@generium.ru

Yana A. Bahareva, GENERIUM;
e-mail: yabahareva@generium.ru

Каргополова Полина Евгеньевна,
АО «ГЕНЕРИУМ»;
e-mail: peignatieva@ibcgenerium.ru

Polina E. Kargopolova, GENERIUM;
e-mail: peignatieva@ibcgenerium.ru

Васильев Александр Павлович,
АО «ГЕНЕРИУМ»;
e-mail: vasilev@ibcgenerium.ru

Aleksander P. Vasiliev, GENERIUM;
e-mail: vasilev@ibcgenerium.ru

Казаров Александр Александрович,
АО «ГЕНЕРИУМ»;
e-mail: kazarov@ibcgenerium.ru

Aleksander A. Kazarov, GENERIUM;
e-mail: kazarov@ibcgenerium.ru

Лыков Максим Валерьевич, к.м.н.,
АО «ГЕНЕРИУМ»;
e-mail: lykov@ibcgenerium.ru

Maksim V. Lykov, Cand. Sci. (Med.), GENERIUM;
e-mail: lykov@ibcgenerium.ru

Хамитов Равиль Авгатович, д.м.н., проф.,
заслуженный деятель науки РФ,
АО «ГЕНЕРИУМ»

Ravil A. Khamitov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Honored
Scientist of the Russian Federation, GENERIUM

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author



ГЕНОПРОТЕКТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ АНТОЦИАНСОДЕРЖАЩЕГО КОМПЛЕКСА *ARONIA MELANOCARPA*

О.Ю. Рыбалкина^{1,2,*}, О.В. Неупокоева¹, О.Л. Воронова¹, Т.Г. Разина¹,
Г.И. Калинин², В.Ю. Андреева², Е.А. Киселева¹, А.А. Чурин¹,
Е.П. Зуева¹, В.В. Жданов¹

¹ Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины
имени Е.Д. Гольдберга ФГБНУ «Томский национальный исследовательский центр РАН»
634028, Российская Федерация, Томск, пр. Ленина, 3

² ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России
634050, Российская Федерация, Томск, Московский тракт, 2

Антоцианы относятся к флавоноидным соединениям, входящим в группу полифенолов. Одной из богатых этой группой БАВ является *A. melanocarpa* (Michx.) Elliott. — рябина черноплодная. Химический анализ показал, что антоцианосодержащий комплекс, полученный из плодов *A. melanocarpa*, состоит из антоцианов, флавоноидов, фенолокислот и катехинов. Доминирующими компонентами являются антоцианы. Накопилось огромное количество данных, доказывающих, что плоды аронии обладают широким спектром фармакологической активности. С целью оценки безопасности применения антоцианосодержащего комплекса из плодов *A. melanocarpa* проведено генотоксическое исследование растительного комплекса с последующим изучением его влияния на мутагенез на модели доксорубин-индуцированной генотоксичности в клетках костного мозга мышей линии С57В1/6. Показано, что применение растительного комплекса в дозе 225 мг/кг не оказало влияния на цитогенетические показатели клеток костного мозга животных после одно-, двухкратного введения. Использование антоцианосодержащего комплекса привело к снижению повреждения ДНК, вызванного введением доксорубина, через 24, 48 ч после введения цитостатика. Таким образом, представленные данные о снижении повреждающего действия доксорубина на ДНК антоцианосодержащим комплексом *A. melanocarpa* могут стать основой для создания препарата-корректора цитостатической терапии злокачественных новообразований.

Ключевые слова: генотоксичность, доксорубин, антоцианы, *Aronia melanocarpa*, флавоноиды

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: исследование проведено в рамках работ по выполнению государственного задания НИИФирМ им. Е.Д. Гольдберга, Томский НИМЦ, тема «Поиск, разработка и изучение механизмов действия синтетических и природных биологически активных субстанций полученных, в том числе, на основе биотехнологий, для фармакологической коррекции различных патологических процессов».

Для цитирования: Рыбалкина О.Ю., Неупокоева О.В., Воронова О.Л., Разина Т.Г., Калинин Г.И., Андреева В.Ю., Киселева Е.А., Чурин А.А., Зуева Е.П., Жданов В.В. Генотоксическая активность антоцианосодержащего комплекса *Aronia melanocarpa*. *Биомедицина*. 2023;19(4):70–80. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-19-4-70-80>

Поступила 27.06.2023

Принята после доработки 01.10.2023

Опубликована 10.12.2023

GENOPROTECTIVE ACTIVITY OF *ARONIA MELANOCARPA* ANTHOCYANIN-CONTAINING COMPLEX

Olga Yu. Rybalkina^{1,2,*}, Oksana V. Neupokoeva¹, Olga L. Voronova¹,
Tatyana G. Razina¹, Galina I. Kalinkina², Valeria Yu. Andreeva², Elena A. Kiseleva¹,
Aleksy A. Churin¹, Elena P. Zueva¹, Vadim V. Zhdanov¹

¹ Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine,
Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences
634028, Russian Federation, Tomsk, Lenina Ave., 3

² Siberian State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia
634050, Russian Federation, Tomsk, Moskovskiy Tract, 2

Anthocyanins are flavonoid compounds belonging to the group of polyphenols. *A. melanocarpa* (Michx.) Elliott chokeberry is known to be rich in these bioactive substances. The previously conducted chemical analysis showed that an anthocyanin-containing complex obtained from *A. melanocarpa* fruits comprise anthocyanins, flavonoids, phenolic acids, and catechins, with anthocyanins being the dominant components. A large amount of data indicates that *Aronia* fruits exhibit a wide spectrum of pharmacological activity. In this work, we assess the safety of an anthocyanin-containing complex obtained from *A. melanocarpa* fruits by its genotoxic study followed by an analysis of its effect on mutagenesis. To this end, a model of doxorubicin-induced genotoxicity in bone marrow cells of C57Bl/6 mice was used. The plant complex under study at a dose of 225 mg/kg had no effect the cytogenetic parameters of animal bone marrow cells after a single or double administration. The use of the anthocyanin-containing complex led to a decrease in DNA damage caused by the administration of doxorubicin, 24 and 48 hours after the introduction of a cytostatic agent. Hence, the data obtained can serve as the basis for the creation of a drug corrector for cytostatic therapy of malignant neoplasms

Keywords: genotoxicity, doxorubicin, anthocyanins, *Aronia melanocarpa*, flavonoids

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

Funding: the study was carried out as part of the work on the implementation of the state task of the Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, topic "Search, development and study of the mechanisms of action of synthetic and natural biologically active substances obtained, including those based on biotechnology, for the pharmacological correction of various pathological processes".

For citation: Rybalkina O.Yu, Neupokoeva O.V., Voronova O.L., Razina T.G., Kalinkina G.I., Andreeva V.Yu., Kiseleva E.A., Churin A.A., Zueva E.P., Zhdanov V.V. Genoprotective Activity of *Aronia melanocarpa* Anthocyanin-Containing Complex. *Journal Biomed.* 2023;19(4):70–80. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-19-4-70-80>

Submitted 27.06.2023

Revised 01.10.2023

Published 10.12.2023

Введение

В настоящее время наблюдается рост интереса к исследованию растительных продуктов, имеющих широкий спектр биологически активных веществ (БАВ) и применявшихся в народной медицине без научного подтверждения их безвредности и пользы для здоровья. Как отмечают токсикологи, биологи и фармакологи, часто

эффекты природных соединений ослабляются, когда биологически активные смеси разделяются на компоненты и вводятся отдельно [25]. К числу перспективных источников БАВ относится арония черноплодная, *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott семейства Rosaceae. Одной из основных групп БАВ аронии являются антоцианы. Наряду с этими веществами арония содержит другие

фенольные соединения, углеводы, органические кислоты, аминокислоты, минералы, витамины, ароматические соединения [16].

Плоды *A. melanocarpa* являются официальным лекарственным сырьем [4] и внесены в Государственный реестр лекарственных средств (гос. регистрация на сухие плоды № 85/301/5, на свежие — № 71/609/16, № 73/941/24) [5]. В литературе описаны иммуномодулирующие, противовоспалительные, антибактериальные, противовирусные, кардио- и гепатопротекторные, антиоксидантные свойства сырья аронии черноплодной [16]. В экспериментах на животных показана антидиабетическая активность плодов и листьев аронии [18].

В настоящее время в НИИФиРМ имени Е.Д. Гольдберга Томского НИМЦ проводятся исследования антоцианосодержащего комплекса из плодов *A. melanocarpa* (АСК). В экспериментах установлены противоопухолевая, антиметастатическая активность изучаемого растительного средства, а также его способность повышать эффективность химиотерапии перевиваемых опухолей [2, 12]. Кроме того, показано стимулирующее действие АСК на эритроидный росток кроветворения у мышей как с опухолью, так и без нее [11].

Согласно современным рекомендациям, для оценки безопасности новых фармакологических препаратов на этапе доклинических исследований обязательным является изучение их генотоксических свойств. Проведение генотоксикологического исследования соединений растительного происхождения, в частности *A. melanocarpa*, обусловлено способностью некоторых хорошо известных природных средств демонстрировать цитогенетические эффекты *in vivo*. Известно, что растительные соединения поступают в организм в сложных смесях, претерпевают метаболические превращения, что также может оказывать потенциально опасный эффект. Таким образом, **целью настоящей работы** явилось изуче-

ние возможных мутагенных свойств антоцианосодержащего комплекса из плодов *A. melanocarpa*, а также исследование его действия на доксорубицин-индуцированную генотоксичность в клетках костного мозга мышей линии С57В1/6.

Материалы и методы

Эксперимент выполнен на 60 конвенциональных мышах-самках линии С57В1/6 массой 20–21 г в возрасте 3 мес. 1 категории (сертификат качества № 188-05), полученных из отдела экспериментального биомоделирования НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга Томского НИМЦ. Содержание животных и дизайн экспериментальных исследований одобрены Комиссией по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга и соответствовали ГОСТу 33215-2014 «Правила оборудования помещений и организация процедур при работе с лабораторными животными», а также международным правилам, принятым Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза (22.09.2010) по охране животных, используемых в научных целях.

Для моделирования геномных нарушений в клетках костного мозга животных использовали доксорубицин (Doxorubicin) (ДКС) — широко используемый в онкологии цитостатический препарат из группы антибиотиков антрациклинового ряда. Препарат обладает выраженной противоопухолевой активностью. В эксперименте использовали доксорубицин (ДКС) под торговым названием Адрибластин быстрорастворимый (“Pfizer”, США). Препарат растворяли стерильным физ. р-ром и вводили однократно внутривентриально животным в дозе 6 мг/кг.

Объектом исследования являлся АСК, выделенный из плодов *A. melanocarpa* на кафедре фармацевтического анализа СибГМУ. Сырье, культивируемое в окрест-

ностях г. Томска, было собранно в период полного созревания. Плоды сушили тепловой конвекторной сушкой при температуре 40–50°C до воздушно-сухого состояния.

АСК получали 95% этанолом, содержащим 1% кислоты хлористоводородной концентрированной, методом противоточной многоступенчатой реперколяции с законченным циклом. Готовый растительный комплекс отстаивали при температуре не выше +10°C не менее 2 сут до получения прозрачной жидкости, затем фильтровали и хранили при температуре не выше +5°C в защищенном от света месте. Сухой остаток АСК определяли с помощью весового влагометра MS-70 («AND», Япония).

Содержание биологически активных веществ в растительном комплексе определяли спектрофотометрическим методом с использованием комплексообразующей реакции с 5% спиртовым р-ром алюминия хлорида [6]. Показания снимали на спектрофотометре СФ-2000. Расчет суммы флавоноидов проводили с использованием удельного показателя поглощения ($E_{1\text{см}}^{1\%}$) комплекса рабочего стандартного образца рутина с алюминия хлоридом при длине волны 415,00 нм равного 260,00. Определение фенолокислот и антоцианов в исследуемом экстракте проводили методом прямой спектрофотометрии. В качестве стандартных образцов использовали кислоту хлорогеновую (фенолокислоты) и цианидин-3-О-глюкозид (антоцианы). Содержание фенолокислот определяли по удельному показателю поглощения ($E_{1\text{см}}^{1\%}$) кислоты хлорогеновой, который при длине волны 327,00±2,00 нм составляет 507,00±2,00 нм [8]. Для расчета суммы антоцианов в экстракте использовали удельный показатель поглощения ($E_{1\text{см}}^{1\%}$) известного вещества цианидин-3-О-глюкозида, который при длине волны 546,00±2,00 нм составляет 100,00±2,00 нм [1]. Катехины определяли спектрофотометрическим методом, основанном на образовании комплекса

свободных катехинов с железо-тарtratным реактивом в присутствии фосфатного буфера [9]. Содержание аскорбиновой кислоты и органических кислот определяли титриметрическим методом [6].

АСК деалкоголизировали на водяной бане, доводили до прежнего объема дистиллированной водой и вводили здоровым мышам внутрижелудочно в дозе 225 мг/кг (в расчете на сухой остаток) одновременно с доксорубицином с первых суток и затем ежедневно в течение 10 сут. Основанием для выбора дозы АСК послужили результаты ранее проведенных экспериментов [2, 12]. Животные контрольной группы получали эквивалентное количество дистиллированной воды *per os* по схеме АСК и физ. р-р внутривбрюшинно в день введения цитостатика.

Для оценки цитогенетических нарушений через 24, 48 ч после введения цитостатика исследовали хромосомы в метафазных пластинках костного мозга по модифицированному методу Форда [10]. На препаратах обнаруживались клетки с одиночными фрагментами, пробелами хромосом, их учитывали на 100 исследованных клеток от каждого животного. Подсчитывали количество клеток с хромосомными и парными повреждениями и редукцию генотоксического эффекта в %. Сроки исследования были выбраны с целью изучения в динамике процесса становления и элиминации мутаций. Так, 24 и 48 ч являются стандартными согласно «Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [10].

Редукцию генотоксического эффекта мутагена (РГЭ) вычисляли по формуле:

$$\text{РГЭ} = ((M - (AM + M)/M) \times 100 \%,$$

где M — частота мутаций, индуцированных мутагеном; AM+M — частота мутаций, наблюдаемых в варианте комбинированного воздействия антимуагена и мутагена. Этот показатель отражает долю мутаций, редуцируемых антимуагеном [3].

Полученные данные подвергались статистической обработке методами вариационной статистики с использованием пакета программ «StatPlus 2009». Вычисляли среднее значение (M) и стандартную ошибку среднего (m). При распределениях, отличных от нормального, использовали непараметрический критерий Вилкоксона — Манна — Уитни. Достоверность различий между качественными признаками проверяли при помощи ϕ — углового преобразования Фишера. Уровень значимости критериев задавали равным 1 и 5%.

Результаты и их обсуждение

Химический анализ показал, что АСК, выделенный из плодов *A. melanocarpa*, состоит из антоцианов, флавоноидов, фенолокислот и катехинов. Доминирующими компонентами являются антоцианы. При проведении стандартизации АСК из плодов *A. melanocarpa*, полученного на 95% подкисленном этаноле, показано, что сухой остаток экстракта составляет $15,00 \pm 0,27\%$ и содержит $5,83 \pm 0,25\%$ антоцианов. Помимо фенольных соединений, АСК из плодов *A. melanocarpa* содержит в своем составе органические кислоты ($4,70 \pm 0,40\%$ сух. остатка) и аскорбиновую кислоту ($0,87 \pm 0,02\%$ сух. остатка) (табл. 1).

Представленные данные о химическом составе растительного комплекса согласуются

с имеющимися в литературе сведениями. Так, антоцианы по количественному содержанию являются доминирующим классом полифенолов. В основном они представляют собой смесь четырех различных гликозидов цианидина: 3-О-галактозида, 3-О-глюкозида, 3-О-арабинозида и 3-О-оксилозида. Кроме того, в минимальном количестве в аронии представлены другие антоцианы: пеларгонидин 3-О-галактозид и пеларгонидина арабинозид. Общее содержание антоцианов может колебаться от 307 до 1480 мг на 100 г сырой массы [19].

В эпоху импортозамещения интерес к изучению новых фармакологических свойств различных биологически активных соединений, в частности антоцианов, обусловлен наличием у этих веществ широкого спектра потенциальных мишеней, на которые они могут воздействовать на уровне как структурных и функциональных систем в клетке, так и в организме в целом. Известно, что антоцианы активно метаболизируются в ЖКТ. Именно эти метаболиты, из-за своей повышенной биодоступности, более биологически активны, чем исходные антоцианы. *A. melanocarpa* является одним из самых богатых источников полифенолов среди других растений и отличается высоким содержанием процианидинов, антоцианидинов, в то время как флавонолы присутствуют в небольших количествах [16].

Известно, что среди растительных биологически активных веществ встречаются генотоксиканты, проявляющие эти эффекты в высоких дозах. Так, ряд исследователей демонстрируют генотоксичность флавоноидов *in vitro* и *in vivo*. В качестве примера можно привести известные и распространенные соединения этого ряда — кверцетин и генистеин [7]. С целью выявления генотоксических свойств изучаемого антоциансодержащего комплекса в эксперимент была включена группа животных, которым его вводили изолиро-

Таблица 1. Содержание фенольных соединений в антоциансодержащем комплексе из плодов *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot., полученном на 95% подкисленном этаноле (% на сухой остаток экстракта)

Table 1. The content of phenolic compounds in the anthocyanin-containing complex from the fruits of *A. melanocarpa* (Michx.) Elliot., obtained on 95% acidified ethanol (% of the dry residue of the extract)

БАВ	Сухой остаток, %
Антоцианы	$5,83 \pm 0,25$
Флавоноиды	$3,25 \pm 0,20$
Фенолокислоты	$0,27 \pm 0,01$
Катехины	$0,24 \pm 0,02$

ванно. Показано, что АСК, используемый в дозе 225 мг/кг, не оказывал влияния на цитогенетические показатели клеток костного мозга животных после одно-, двухкратного введения (табл. 2).

Доказательство полезности полифенолов в химиотерапии злокачественных новообразований требует неопровержимого экспериментального подтверждения. В эксперименте, посвящённом изучению влияния антоцианосодержащего комплекса из плодов *A. melanocarpa* на генотоксическое действие цитостатика, получены следующие результаты. Через 24 ч после введения доxorубина в дозе 6 мг/кг в клетках костного мозга показано увеличение числа клеток с хромосомными повреждениями в 5,9 раза ($p < 0,01$) по сравнению с соответствующим показателем у животных контрольной группы. Среди нарушений в результате цитостатического воздействия были обнаружены одиночные фрагменты и пробелы: их количество возросло в 30,0 и 3,9 раза ($p < 0,01$) соответственно. Кроме того, присутствовали единичные парные фрагменты (рис.). Через 48 ч наблюдения

цитогенетические показатели клеток костного мозга в группе мышей, получавших противоопухолевый препарат, оставались на том же уровне (табл. 2). Полученные результаты изучения влияния доxorубина на ДНК клеток согласуются с данными литературы. Показано, что антрациклиновый антибиотик способен вызывать нарушения в структуре ДНК посредством ингибции топоизомеразы II, а также активации окислительного стресса [20].

Основным критерием эффективности перспективных генопротекторных средств является уменьшение доли метафазных пластинок с aberrантными нарушениями. Анализ метафаз клеток костного мозга мышей в группе, получавшей доxorубин и АСК из плодов *A. melanocarpa*, позволил выявить снижение повреждающего действия цитостатика во все сроки наблюдения. Через 24 ч после введения цитостатического препарата в группе его сочетанного использования с АСК доля метафазных пластинок с пробелами хромосом снизилась в 4,4 раза, а клеток с хромосомными повреждениями — в 1,6 раза по сравнению



Рис. 1. Фотографии метафазных пластинок костного мозга мышей-самок линии C57Bl/6 через 24 ч после однократного введения доxorубина (а) и антоцианосодержащего комплекса из плодов *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot. L. (b). Окраска азур-эозином, иммерсионный объектив 100.

Примечание: стрелкой показаны структурные нарушения (одиночный фрагмент).

Fig. 1. Photographs of metaphase plates of the bone marrow of female mice of the C57Bl/6 line 24 hours after a single injection of doxorubicin (a) and anthocyanin-containing complex from the fruits of *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot. L. (b). Stained with azure-eosin, immersion objective 100.

Note: the arrow shows structural disturbances (single fragment).

Таблица 2. Динамика цитогенетических показателей клеток костного мозга мышцей-самок линии C57Bl/6 после однократного введения доксорубина и АСК из плодов *A. melanocarpa* (Michx.) Elliot ($M \pm m$)
Table 2. Dynamics of cytogenetic parameters of bone marrow cells of C57Bl/6 female mice after a single injection of doxorubicin and ASA from the fetuses of *A. melanocarpa* (Michx.) Elliot ($M \pm m$)

Группа наблюдения, доза × количество введений (число животных в группе)	Одиночных фрагментов ($M \pm m$) на 100 исследованных метафаз	Пробелов хромосом (гепов) ($M \pm m$)	Клетки с хромосомными повреждениями, %	РГЭ, %
Через 24 ч после введения доксорубина				
1. Контроль (n=5)	0,20±0,20	1,80±0,66	2,00±0,63	
2. ДКС, 6 мг/кг × 1 (n=5)	6,00±1,26	7,00±1,10	11,80±1,02	
	1–2 (p<0,01)	1–2 (p<0,01)	1–2 (p<0,01)	
3. ДКС, 6 мг/кг × 1 + АСК, 225 мг/кг × 1 (n=5)	6,60±0,68	1,60±0,51, 2–3 (p<0,01)	7,60±0,40, 2–3 (p<0,01)	36
4. АСК, 225 мг/кг × 1 (n=5)	0,60±0,40	0,80±0,58	1,40±0,93	
Через 48 ч после введения доксорубина				
1. Контроль (n=5)	0,80±0,49	0,80±0,49	1,60±0,75	
2. ДКС, 6 мг/кг × 1 (n=5)	4,20±1,50	8,00±0,89	12,20±1,28	
	1–2 (p<0,01)	1–2 (p<0,01)	1–2 (p<0,01)	
3. ДКС, 6 мг/кг × 1 + АСК, 225 мг/кг × 2 (n=5)	3,80±1,02	1,00±0,32, 2–3 (p<0,01)	4,60±0,68, 2–3 (p<0,01)	62
4. АСК, 225 мг/кг × 2 (n=5)	3,20±1,36	0,80±0,49	3,60±1,33	

Примечание: в группы включали по 5 животных, у каждой мыши исследовали 100 клеток. Перед уровнем значимости *p* указаны номера сравниваемых групп.

Note: the groups included 5 animals, 100 cells were examined in each mouse. Before the significance level *p*, the numbers of the compared groups are given.

с показателями у мышей в группе монохимиотерапии (табл. 2). Парных фрагментов не выявлено. Через 48 ч зафиксировано снижение количества метафаз со структурными нарушениями после двукратного применения АСК: процентное содержание клеток с пробелами и хромосомными повреждениями уменьшалось, соответственно, в 8,0 и 2,7 раза в группе комбинированного использования цитостатика и средства растительного происхождения (табл. 2). Следует отметить, что показатели редукции генотоксического эффекта в группах комбинированного применения доксорубина и АСК, зафиксированные по отношению к группе изолированного использования цитостатика, составили 36 и 62% через 24 и 48 ч соответственно. Показатель редукции генотоксического эффекта является высоким, если превышает 50%.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о выраженном генопротекторном действии антоцианосодержащего комплекса из плодов *A. melanocarpa* в условиях повреждения клеток костного мозга доксорубином. Обсуждая возможный механизм защитного действия на ДНК растительного комплекса, следует отметить его выраженное антиоксидантное действие, превышающее многие известные природные антиоксиданты. Антирадикальное действие антоцианов обусловлено их структурными особенностями: числом гидроксильных групп, наличием катехинового фрагмента в В-кольце и иона оксония в С-кольце, паттерном гидроксирования, метилирования, ацилирования и гликозилирования [17]. Среди антоциановых агликонов наибольшую антиоксидантную активность проявляют цианидин, дельфинидин, за которыми в порядке уменьшения сле-

дуют мальвидин, пеонидин, пеларгонидин, петунидин [21].

В организме человека антиоксидантные свойства антоцианов реализуются путем их прямого взаимодействия со свободными радикалами. Так, в работе [24] показано, что фенольные соединения, содержащиеся в плодах аронии, являются наиболее активными поглотителями катион-радикала ABTS (2,2'-азинобис(3-этилбензотиазолин-6-сульфонат). Оценка антиоксидантной активности экстрактов из ежевики, черной смородины, аронии, малины и красной смородины показала, что экстракт *A. melanocarpa* обладает высоким потенциалом снижения числа свободных радикалов DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил) [14]. Аналогичные результаты, полученные другими авторами, подтвердили способность этанольных экстрактов аронии, богатых фенольными соединениями, удалять радикал DPPH [22]. Известно, что основной вклад в удаление радикалов DPPH вносит антоциановая фракция (66,7%), за которой следуют проантоцианидиновые фракции (25,1%), флавонолы и фенольные кислоты (8,2% от общей активности) [15].

Другим механизмом действия антоцианов, приводящим к удалению свободных радикалов, может быть модулирование антиоксидантной защитной системы организма [23]. Так, показана способность антоцианов связываться в цитоплазме с AhR-

рецептором, проходить в ядро и запускать альтернативную транскрипцию генов, экспрессирующих детоксицирующие ферменты, — глутатион эстрэнсферазу (GSTP), супероксиддисмутазу, каталазу, что резко уменьшает повреждение ДНК. Известно, что процианидины являются ингибиторами NADPH-оксидазы, кофермента некоторых ферментов, катализирующих окислительно-восстановительные реакции в живых клетках [13].

Выводы

Таким образом, представленные данные о снижении повреждающего действия доксорубина на ДНК антоцианосодержащим комплексом *A. melanocarpa* могут стать основой для создания препарата-корректора цитостатической терапии злокачественных новообразований. Область применения подобных растительных комплексов может не ограничиваться их использованием в онкологии. Известно, что токсическим действием на генетический аппарат клеток обладают многие известные препараты, которые относятся к различным фармакологическим группам (противовоспалительные, противовирусные, психотропные, противосудорожные и др.). С целью снижения генотоксического действия применяемой фармакотерапии может быть рекомендован антоцианосодержащий комплекс из плодов *A. melanocarpa*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Андреева В.Ю., Калинин Г.И., Коломиец Н.Э., Исайкина Н.В. Методика определения антоцианов в плодах аронии черноплодной. *Фармация*. 2013;3:19–21. [Andreeva V.Yu., Kalinkina G.I., Kolomiec N.E., Isajkina N.V. Metodika opredeleniya antocianov v plodah aronii chernoplodnoj. [Method for the determination of anthocyanins in the fruits of black chokeberry]. *Pharmacy*. 2013;3:19–21. (In Russian)].
2. Андреева В.Ю., Шейкин В.В., Калинин Г.И., Разина Т.Г., Зуева Е.П., Рыбалкина О.Ю., Ульрих А.В. Разработка средства на основе плодов аронии черноплодной (*Arónia melanocárpa* (Michx.) Elliot), повышающего эффективность химиотерапии опухолей. *Химия растительного сырья*. 2020;4:219–226. [Andreyeva V.Yu., Sheykin V.V., Kalinkina G.I., Razina T.G., Zuyeva Ye.P., Rybalkina O.Yu., Ul'rikh A.V. Razrabotka sredstva na osnove plodov aronii chernoplodnoj (*Arónia melanocárpa* (Michx.) Elliot), povyshayushchego effektivnosti' himioterapii opuholej [Development of a drug based on the fruits of chokeberry (*Arónia melanocárpa* (Michx.) Elliot), which increases the effectiveness of tumor chemotherapy]. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya* [Chemistry of plant materials]. 2020;4:219–226. (In Russian)]. DOI: 10.14258/jcprn.2020046339.

3. Гончарова Р.И., Даливеля О.В., Кужир Т.Д. Кластогенность этилметансульфоната и диметилтерефталата в микроядерном тесте и пути ее модификации. *Цитология и генетика*. 2002;36(1):14–25. [Goncharova R.I., Dalivelya O.V., Kuzhir T.D. Klastogennost' etilmetansul'fonata i dimetil'tereftalata v mikroyadernom teste i puti ee modifikatsii [Clastogenicity of ethyl methanesulphonate and dimethyl terephthalate in the micronucleus test and ways of its modification]. *Cytology and genetics*. 2002;36(1):14–25. (In Russian)].
4. Государственный реестр лекарственных средств: науч. издание. М.: Минздрав России. 2020:1006. [Gosudarstvennyy reestr lekarstvennykh sredstv: nauch. izdanie [State Pharmacopoeia of the Russian Federation: scientific publication]. Moscow: Minzdrav Rossii. 2020:1006. (In Russian)].
5. Государственная Фармакопея Российской Федерации: науч. издание. М.: Минздрав России. 2007:684. [Gosudarstvennaya Farmakopeya Rossijskoj Federacii: nauch. izdanie [State Pharmacopoeia of the Russian Federation: scientific publication]. Moscow: Minzdrav Rossii. 2007:684. (In Russian)].
6. Государственная Фармакопея Российской Федерации: науч. издание. М.: Минздрав России. 2018:1004. [Gosudarstvennaya Farmakopeya Rossijskoj Federacii: nauch. izdanie [State Pharmacopoeia of the Russian Federation: scientific publication]. Moscow: Minzdrav Rossii. 2018:1004. (In Russian)].
7. Дурнев А.Д., Лапицкая А.С. Генотоксикология соединений растительного происхождения. *Экологическая генетика*. 2012;10(3):41–52. [Durnev A.D., Lapickaya A.S. Genotoksikologiya soedinenij rastitel'nogo proiskhozhdeniya [Genotoxicology of compounds of plant origin] *Ekologicheskaya genetika [Environmental genetics]*. 2012;10(3):41–52. (In Russian)].
8. Коломиец Н.Э., Калинин Г.И., Сапронова Н.Н. Стандартизация листьев крапивы. *Фармация*. 2011;6:22–24. [Kolomiec N.E., Kalinkina G.I., Saproнова N.N. Standartizatsiya list'ev krapivy [Nettle leaf standardization]. *Pharmacy*. 2011;6:22–24. (In Russian)].
9. Красникова Е.В. Разработка технологии натурального пищевого красителя из аронии черноплодной с использованием искусственного холода: дис. ... канд. техн. наук. С.-Пб, 2003:148. [Krasnikova E.V. Razrabotka tekhnologii natural'nogo pishchevogo krasitelya iz aronii chernoplodnoj s ispol'zovaniem iskusstvennogo holoda [Development of technology for natural food coloring from chokeberry using artificial cold]: dis. ... cand. tekhn. sci. Saint Petersburg, 2003:148. (In Russian)].
10. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Под ред. Р.У. Хабриева. 2-е изд., перераб. и доп. М.: Медицина, 2005:832. [Rukovodstvo po eksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniyu novykh farmakologicheskikh veshchestv [Guidelines for the experimental (preclinical) study of new pharmacological substances]. Ed. by R.U. Khabriev. 2nd ed., revised. and additional. Moscow: Medicina Publ. 2005:832. (In Russian)].
11. Рыбалкина О.Ю., Разина Т.Г., Зуева Е.П., Андреева В.Ю., Зюзьков Г.Н., Калинин Г.И., Жданов В.В. Перспективы использования *Aronia melanocarpa* (Rosaceae) в онкологической практике. *Растительные ресурсы*. 2022;58(3):222–235. [Rybalikina O.Yu., Razina T.G., Zueva E.P., Andreeva V.Yu., Zyuz'kov G.N., Kalinkina G.I., Zhdanov V.V. Perspektivy ispol'zovaniya *Aronia melanocarpa* (Rosaceae) v onkologicheskoy praktike [Prospects for the use of *Aronia melanocarpa* (Rosaceae) in oncological practice]. *Rastitel'nye resursy [Plant resources]*. 2022;58(3):222–235. (In Russian). DOI: 10.31857/S0033994622030098.
12. Рыбалкина О.Ю., Разина Т.Г., Сафонова Е.А., Киселева Е.А., Ульрих А.В., Андреева В.Ю., Исайкина Н.В., Калинин Г.И., Зуева Е.П. *Aronia melanocarpa* и *Sorbus aucuparia* (Rosaceae) как перспективные источники получения антоцианосодержащих комплексов для дополнительной терапии перевиваемых опухолей. *Растительные ресурсы*. 2021;2:186–192. [Rybalikina O.Yu., Razina T.G., Safonova E.A., Kiseleva E.A., Ul'rikh A.V., Andreeva V.Yu., Isaikina N.V., Kalinkina G.I., Zueva E.P. *Aronia melanocarpa* i *Sorbus aucuparia* (Rosaceae) kak perspektivnye istochniki polucheniya antocianosoderzhashchih kompleksov dlya dopolnitel'noy terapii perevivayemykh opuholej [Aronia melanocarpa and Sorbus aucuparia (Rosaceae) as promising sources for obtaining anthocyanin-containing complexes for additional therapy of transplantable tumors] *Rastitel'nye resursy [Plant resources]*. 2021;2:186–192. (In Russian). DOI: 10.31857/S0033994621020072.
13. Álvarez E., Rodiño-Janeiro B.K., Jerez M., Uceda-Somoza R., Núñez M.J., González-Juanatey J.R. Procyanidins from grape pomace are suitable inhibitors of human endothelial NADPH oxidase. *J. Cell Biochem*. 2012;113(4):1386–1396. DOI: 10.1002/jcb.24011.
14. Benvenuti S., Pellati F., Melegari M., Bertelli D. Polyphenols, anthocyanins, ascorbic acid, and radical scavenging activity of *Robus*, *Ribes* and *Aronia*. *J. Food Sci*. 2004;69:164–169.
15. Jakobek L., Šeruga M., Medvidović-Kosanović M., Novak I. Anthocyanin content and antioxidant activity of various red fruit juices. *Deutsche Lebensm. — Rundsch*. 2007;103:58–64.
16. Jurendic T., Scetar M. *Aronia melanocarpa* Products and By-Products for Health and Nutrition: A Review. *Antioxidants (Basel)*. 2021;10(7):1052. DOI: 10.3390/antiox10071052.
17. Yang M., Koo S.I., Song W.O., Chun O.K. Food matrix affecting anthocyanin bioavailability: review. *Curr*

- Med. Chem.* 2011;18(2):291–300. DOI: 10.2174/092986711794088380.
18. Kokotkiewicz A., Jaremicz Z., Luczkiewicz M. Aronia Plants: A Review of Traditional Use, Biological Activities, and Perspectives for Modern Medicine. *J. Med. Food.* 2010;13:255–269. DOI: 10.1089/jmf.2009.0062.
19. Kulling S.E., Rawel H. Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) — A Review on the Characteristic Components and Potential Health Effects. *Planta Medica.* 2008;74:1625–1634. DOI: 10.1055/s-0028-1088306.
20. Lu Y., Xu D., Zhou J., Ma Y., Jiang Y., Zeng W., Dai W. Differential responses to genotoxic agents between induced pluripotent stem cells and tumor cell lines. *J. Hematol. Oncol.* 2013;6(1):71. DOI: 10.1186/1756-8722-6-71.
21. Lucioli S. Anthocyanins: mechanism of action and therapeutic efficacy. In: Capasso A. (Ed.). *Medicinal Plants as Antioxidant Agents: Understanding Their Mechanism of Action and Therapeutic Efficacy Research Signpost.* Kerala, India. 2012:27–57.
22. Nakajima J., Tanaka I., Seo S., Yamazaki M., Saito K. LC/PDA/ESI-MS profiling and radical scavenging activity of anthocyanins in various berries. *J. Biomed. Biotechnol.* 2004;5:241–247.
23. Shih P.H., Yeh C.T., Yen G.C. Anthocyanins induce the activation of phase II enzymes through the antioxidant response element pathway against oxidative stress-induced apoptosis. *J. Agric. Food Chem.* 2007;55(23):9427–9435. DOI: 10.1021/jf071933i.
24. Tarko T., Duda-Chodak A., Sroka P., Satora P., Michalik J. Transformations of phenolic compounds in an in vitro model simulating the human alimentary tract. *Food Technol. Biotechnol.* 2009;47:456–463.
25. Yudina R.S., Gordeeva E.I., Shoeva O.Y., et al. Anthocyanins as functional food components. *Vavilovskii Zhurnal Genet Seleksii.* 2021;25(2):178–189. DOI: 10.18699/VJ21.022.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHOR

Рыбалкина Ольга Юрьевна*, к.б.н., доц., Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН»; ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России;
e-mail: olgatomsk87@gmail.com

Неупокоева Оксана Владимировна, к.б.н., Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН»;
e-mail: repaov@mail.ru

Воронова Ольга Леонидовна, к.б.н., Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН»;
e-mail: repaov@mail.ru

Разина Татьяна Георгиевна, д.б.н., Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН»;
e-mail: razinatg22@gmail.com

Olga Yu. Rybalkina*, Cand. Sci. (Biol.), Assoc. Prof., Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences; Siberian State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: olgatomsk87@gmail.com

Oksana V. Neupokoeva, Cand. Sci. (Biol.), Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: repaov@mail.ru

Olga L. Voronova, Cand. Sci. (Biol.), Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: repaov@mail.ru

Tatyana G. Razina, Dr. Sci. (Biol.), Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: razinatg22@gmail.com

Калинкина Галина Ильинична, д.фарм.н., проф., ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России;
e-mail: galina_kalinkina@mail.ru

Galina I. Kalinkina, Dr. Sci. (Pharm.), Prof., Siberian State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: galina_kalinkina@mail.ru

Андреева Валерия Юрьевна, к.б.н., доц., ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России;
e-mail: vilival@yandex.ru

Valeria Yu. Andreeva, Cand. Sci. (Biol.), Assoc. Prof., Siberian State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: vilival@yandex.ru

Киселева Елена Александровна, Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН»;
e-mail: elena_kis@sibmail.com

Elena A. Kiseleva, Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: elena_kis@sibmail.com

Чурин Алексей Александрович, д.м.н., проф. РАН, Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН»;
e-mail: drugtox@gmail.com

Aleksey A. Churin, Dr. Sci. (Med.), Prof. of the RAS, Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: drugtox@gmail.com

Зуева Елена Петровна, д.б.н., проф., Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН»;
e-mail: zep0929@mail.ru

Elena P. Zueva, Dr. Sci. (Biol.), Prof., Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: zep0929@mail.ru

Жданов Вадим Вадимович, д.м.н., проф., член-корр. РАН, Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН»;
e-mail: zhdanov_vv@pharmso.ru

Vadim V. Zhdanov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Corr. Member of RAS, Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: zhdanov_vv@pharmso.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ III ФАЗЫ: МНОГОЦЕНТРОВОЕ РАНДОМИЗИРОВАННОЕ ДВОЙНОЕ СЛЕПОЕ ПЛАЦЕБО-КОНТРОЛИРУЕМОЕ В ПАРАЛЛЕЛЬНЫХ ГРУППАХ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ И БЕЗОПАСНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА ДИРЕКОРД У ПАЦИЕНТОВ С ИШЕМИЧЕСКИМ ИНСУЛЬТОМ В РАННЕМ ВОССТАНОВИТЕЛЬНОМ ПЕРИОДЕ

И.А. Помыткин^{1*}, В.В. Писарев², М.Е. Меркулов², Л.В. Лукиных³,
М.В. Моржухина⁴, Н.Н. Каркищенко¹

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

² ООО «Научно-производственный центр Пробиотек»
119992, Российская Федерация, Москва, мкр. Ленинские горы, 1, стр. 75В

³ ГБУЗ Ленинградской области «Всеволожская клиническая межрайонная больница»
188643, Российская Федерация, Ленинградская обл., Всеволожский р-н, Всеволожск, Колтушское ш., 20

⁴ ГБУЗ Ярославской области «Клиническая больница № 2»
150030, Российская Федерация, Ярославская обл., Ярославль, Суздальское ш., 39

Дирекорд — оригинальный препарат, содержащий действующее вещество дихолинсукцинат, улучшающее чувствительность инсулиновых рецепторов в нейронах к инсулину. Целью работы была оценка эффективности и безопасности препарата у пациентов с ишемическим инсультом в раннем восстановительном периоде. 160 пациентов после первого ишемического инсульта в каротидной системе, подтвержденного компьютерной или магнитно-резонансной томографией, с давностью инсульта от 3 недель до 2 мес., средний возраст $63,2 \pm 8,4$ года, рандомизировали в две терапевтические группы. В первой группе ($n=80$) пациентам вводили внутримышечно Дирекорд в дозе 600 мг/сут, а во второй ($n=80$) — плацебо в течение двух недель. Ответом на терапию считалось улучшение неврологического статуса, функционального состояния и когнитивных функций пациентов: как минимум двукратное снижение общего счета по шкале NIHSS, общий счет по шкале Бартел ≥ 95 , общий счет по шкале MoCA ≥ 26 . Анализ первичной конечной точки исследования с помощью точного критерия Фишера показал, что Дирекорд статистически значительно превосходит плацебо ($p=0,017$) по числу пациентов, ответивших на терапию, — 23,7 и 8,7% пациентов в группах соответственно. Анализ вторичных точек исследования выявил статистически значимое превосходство исследуемого препарата перед плацебо в снижении неврологического дефицита по шкале NIHSS ($p=0,004$), снижении показателей нарушения жизнедеятельности по шкале Рэнкина ($p=0,0357$), а также по шкалам общего клинического впечатления CGI-I ($p<0,001$) и PGI-I ($p<0,001$). Дирекорд имеет хороший профиль безопасности — статистически значимых различий с плацебо не было выявлено ни по одному из показателей безопасности, включая число нежелательных явлений, показатели жизнедеятельности, лабораторные показатели и ЭКГ. В целом Дирекорд статистически значительно превосходит плацебо по эффективности в качестве средства для восстановления функций и повседневной активности после перенесенного ишемического инсульта.

Ключевые слова: Дирекорд, дихолинсукцинат, нейрональный инсулин-сенситайзер, клиническое исследование III фазы, ишемический инсульт, ранний восстановительный период

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: ООО «Эллара», 601122, Российская Федерация, Владимирская обл., Петушинский р-н, г. Покров, ул. Франца Штольверка, 20.

Для цитирования: Помыткин И.А., Писарев В.В., Меркулов М.Е., Лукиных Л.В., Моржухина М.В., Каркищенко Н.Н. Результаты клинического исследования III фазы: многоцентровое рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое в параллельных группах исследование эффективности и безопасности лекарственного препарата Дирекорд у пациентов с ишемическим инсультом в раннем восстановительном периоде. *Биомедицина*. 2023;19(4):81–93. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-19-4-81-93>

Поступила 20.08.2023

Принята после доработки 10.10.2023

Опубликована 10.12.2023

RESULTS OF PHASE III CLINICAL TRIAL: A MULTICENTER, RANDOMIZED, DOUBLE-BLIND, PLACEBO-CONTROLLED, PARALLEL GROUP STUDY OF THE EFFICACY AND SAFETY OF DIREKORD IN ISCHEMIC STROKE PATIENTS IN EARLY RECOVERY PERIOD

Igor A. Pomytkin^{1,*}, Vladimir V. Pisarev², Mikhail E. Merkulov², Liya V. Lukinykh³,
Marina V. Morzhukhina⁴, Nikolay N. Karkischenko¹

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 Scientific and Production Center Probiotech
119992, Russian Federation, Moscow, Leninskie Gory Mcd., 1, Build. 75V

³ Vsevolozhsk Clinical Interdistrict Hospital
188643, Russian Federation, Leningrad Region, Vsevolozhsk District, Vsevolozhsk, Koltushskoe Highway, 20

⁴ Yaroslavl Clinical Hospital No. 2
150030, Russian Federation, Yaroslavl Region, Yaroslavl, Suzdal Highway, 39

Direkord is an original drug containing the active substance of dicholine succinate, which improves the sensitivity of insulin receptors in neurons to insulin. The aim of this work was to evaluate the efficacy and safety of the drug in ischemic stroke patients in the early recovery period. In total, 160 patients after the first ischemic stroke in the carotid system, confirmed by computed or magnetic resonance imaging, with a stroke duration from 3 weeks to 2 months, mean age 63.2 ± 8.4 years, were randomized into two treatment groups. The first group ($n=80$) received Direkord intramuscularly at a dose of 600 mg/day for two weeks; the second group ($n=80$) received a placebo. Treatment response was defined as an improvement in neurological status, functional status, and cognitive function of the patients: at least a two-fold decrease in the total NIHSS score, the total Barthel score ≥ 95 , and the total MoCA score ≥ 26 . The analysis of the primary endpoint of the study using exact Fisher's test showed that Direkord was statistically significantly superior to the placebo ($p=0.017$) in the number of patients who responded to the therapy — 23.7 and 8.7% of patients in groups, respectively. The secondary end point analysis revealed a statistically significant superiority of Direkord over the placebo in reducing neurological deficits on the NIHSS scale ($p=0.004$), on the Rankin scale ($p=0.0357$), and on the CGI-I ($p<0.001$) and PGI-I ($p<0.001$) global clinical impression scales. Direkord has a good safety profile; thus, no statistically significant differences were found with the placebo in any of the safety parameters, including the number of adverse events, vital signs, laboratory parameters, and ECG. Overall, Direkord is statistically significantly more effective than placebo in recovering function and daily activities after ischemic stroke.

Keywords: Direkord, dicholin succinate, neuronal insulin sensitizer, phase III clinical trial, ischemic stroke, early recovery period

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

Funding: LLC “Ellara”, 601122, Russian Federation, Vladimir Region, Petushinsky District, Pokrov, Franz Stollwerk str., 20.

For citation: Pomytkin I.A., Pisarev V.V., Merkulov M.E., Lukinykh L.V., Morzhukhina M.V., Karkischenko N.N. Results of Phase III Clinical Trial: a Multicenter, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Parallel Group Study of the Efficacy and Safety of Direkord in Ischemic Stroke Patients in Early Recovery Period. *Journal Biomed.* 2023;19(4):81–93. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-19-4-81-93>

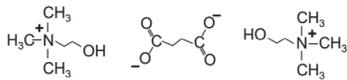
Submitted 20.08.2023

Revised 10.10.2023

Published 10.12.2023

Введение

Дирекорд — оригинальный препарат, содержащий в качестве действующего вещества дихолинсукцинат, соль холина и янтарной кислоты 2:1, имеющую структурную формулу:



Дихолинсукцинат — нейрональный инсулин-сенситайзер, повышающий чувствительность инсулиновых рецепторов в нейронах к низким субоптимальным концентрациям инсулина [8, 12, 13]. Ишемический инсульт сопровождается постинсультной инсулиновой резистентностью — сниженным биологическим ответом на эндогенный инсулин. Статистически значимая положительная корреляция между индексом инсулиновой резистентности НОМА-IR и значениями шкалы тяжести инсульта NIHSS наблюдалась у пациентов без диабета, перенесших ишемический инсульт, причем пациенты с особо высокими значениями НОМА-IR (четвертый квартиль в исследуемой популяции) имели риск неблагоприятного клинического исхода на 429% выше, чем с низкими значениями НОМА-IR (первый квартиль) [7]. В трех исследованиях с общим числом участников 6341 пациенты с высокими значениями НОМА-IR в остром постинсультном периоде имели повышенный риск неблагоприятного функционального исхода в будущем (3 мес. и 7 лет), а также повышенный риск повторного инсульта и смерти в течение

года [1–3]. Поэтому разработка средств, улучшающих чувствительность к инсулину в постинсультном периоде, является новым обоснованным подходом к лечению ишемического инсульта.

Результаты второй фазы клинических исследований показали эффективность и безопасность препарата Дирекорд в улучшении неврологических и функциональных показателей у пациентов с ишемическим инсультом в раннем восстановительном периоде.

Целью работы была оценка эффективности и безопасности препарата Дирекорд, р-р для внутримышечного введения, у пациентов с ишемическим инсультом в раннем восстановительном периоде. Задачами исследования было подтвердить превосходящую эффективность, а также безопасность препарата Дирекорд в сравнении с плацебо.

Материалы и методы

Место проведения и регламентирующие документы

Многоцентровое рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование эффективности и безопасности препарата Дирекорд в параллельных группах с вводным периодом, периодом рандомизированного лечения и продолженного наблюдения проведено с 19.02.2022 по 05.12.2022 г. в двух клинических центрах, одобренных Минздравом РФ: государственном бюджетном учреждении здравоохранения Ярославской области

«Клиническая больница № 2» (ГБУЗ ЯО «КБ № 2», г. Ярославль) и государственном бюджетном учреждении здравоохранения Ленинградской области «Всеволожская клиническая межрайонная больница» (ГБУЗ ЛО «Всеволожская КМБ»). Клиническое исследование III фазы проводилось в соответствии с утвержденным протоколом и этическими принципами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации, международными принципами Надлежащей Клинической Практики (ICH GCP) и регламентировалось действующим законодательством РФ: Конституция РФ; Федеральный закон от 21.11.2011 № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации»; Федеральный закон от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств»; Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р 52379-2005 «Надлежащая клиническая практика» от 27.09.2005 № 232-ст); Постановление Правительства РФ от 13.09.2010 № 714 «Об утверждении типовых правил обязательного страхования жизни и здоровья пациента, участвующего в клинических исследованиях лекарственного препарата»; Приказ МЗ РФ от 01.04.2016 № 200н «Об утверждении правил надлежащей клинической практики»; Приказ Росздравнадзора № 1071 от 15.02.2017 «Об утверждении порядка осуществления фармаконадзора»; Приказ Минпромторга РФ от 14.06.2013 № 916 (ред. от 18.12.2015) «Об утверждении Правил надлежащей производственной практики»; Правила регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения (Решение ЕАЭС от 03.11.2016 № 78); Правила надлежащей клинической практики ЕАЭС (Решение ЕАЭС от 03.11.2016 № 79); Решение ЕАЭС № 87 об утверждении правил фармаконадзора; Постановление Правительства РФ от 18.05.2011 № 393 «О внесении изменений в Типовые правила обязательного страхования жизни и здоровья пациента, участвующего

в клинических исследованиях лекарственного препарата»; Разрешение № 290 от 09.06.2021 на проведение клинического исследования, выданное Минздравом РФ. Протокол исследования, Брошюра исследователя, Информационный листок пациента с формой информированного согласия на участие в исследовании и образец Индивидуальной регистрационной карты были одобрены Советом по этике и локальными этическими комитетами медицинских организаций. Всем добровольцам в ходе разъяснительной беседы и в письменной форме была предоставлена исчерпывающая информация, касающаяся всех аспектов проводимого исследования.

Критерии отбора

В исследовании участвовали 160 пациентов, мужчины и женщины в возрасте от 45 до 80 лет включительно, после первого ишемического инсульта в каротидной системе, подтвержденного компьютерной или магнитно-резонансной томографией, с давностью инсульта не менее 3 недель и не более 2 мес. от момента появления неврологической симптоматики, с оценкой по шкале тяжести инсульта NIHSS от 3 до 8 баллов включительно, оценкой по шкале когнитивных функций MoCA менее 24 баллов, при наличии письменного информированного согласия, подписанного пациентом или его законным представителем, а также готовые и способные к заполнению необходимых шкал и выполнению графика посещений. Критериями невключения были геморрагический инсульт, тотальная афазия, наличие возникших до инсульта сопутствующих заболеваний, таких как значимое ограничение двигательной активности, психические заболевания, деменция; неврологические заболевания, такие как эпилепсия, болезнь Паркинсона, рассеянный склероз; декомпенсированный сахарный диабет, алкоголизм, наркотическая зависимость, злоупотребление психоактивными веществами в анамнезе, почечная недоста-

точность, тяжелая печеночная недостаточность или аномальные значения лабораторных показателей на скрининге, тяжелые сердечно-сосудистые или церебрососудистые заболевания в анамнезе, системное инфекционное заболевание, неконтролируемая артериальная гипертензия с высокими показателями артериального давления (АД выше 220/110 мм рт. ст.). Кроме того, в исследование не включались женщины с сохраненным потенциалом деторождения; лица с известной гиперчувствительностью к любому из компонентов препарата; лица, постоянно принимавшие ноотропные, метаболические и другие антиоксидантные лекарственные средства или биологически активные добавки в течение 30 дней до включения в исследование; лица, принимавшие участие в исследовании любого экспериментального или зарегистрированного лекарственного препарата, изделия медицинского назначения или биологического агента в течение 1 мес. до момента включения. Критериями исключения из исследования были отзыв согласия на лечение исследуемыми препаратами; регистрация обстоятельств, описанных как критерии не включения; серьезное отклонение от протокола; серьезные нежелательные явления или сопутствующие заболевания, которые требуют прекращения исследования; несоблюдение инструкций, данных исследователем, если это вызывает риск для пациента.

Исследуемый препарат

В исследовании использован оригинальный препарат Дирекорд производства ООО «Эллара» (Россия), р-р для внутримышечного введения, действующее вещество — дихолинсукцинат, 100 мг/мл. Химическое наименование: N-(2-гидроксиэтил)-N, N, N — триметиламмония сукцинат (2:1).

План исследования

Пациенты, прошедшие стадию скрининга и подписавшие информированное согласие, были рандомизированы в две группы по 80 человек и получали Дирекорд внутримышечно по 200 мг (2 мл) 3 раза в день

или плацебо внутримышечно по 200 мг (2 мл) 3 раза в день в течение 14 дней (рис. 1).

Оценка эффективности

Первичной конечной точкой была выбрана доля пациентов, ответивших на проводимую терапию на визите 4. Ответом на терапию считается улучшение функционального состояния, когнитивных функций и неврологического статуса пациентов: как минимум двукратное снижение общего счета по шкале тяжести инсульта NIHSS, общий счет по шкале Бартел ≥ 95 , общий счет по шкале MoCA ≥ 26 .

Вторичные конечные точки включали оценку динамики неврологического дефицита по шкале NIHSS (визиты 3, 4 и 5); оценку динамики нарушения жизнедеятельности по шкале Рэнкина (визиты 3, 4 и 5); оценку уровня социальной адаптации и качества жизни пациента по индексу функциональной активности Бартел (визиты 3, 4 и 5); оценку краткой Монреальской шкалы когнитивных функций (MoCA) (визиты 4 и 5); оценку исследователем по шкале общего клинического впечатления CGI-I (Clinical Global Impression — Improvement scale) (визиты 3, 4 и 5); оценку пациентом по шкале общего клинического впечатления пациента PGI-I (Patient Global Impression of Improvement) (визиты 3, 4 и 5).

Оценка безопасности

Безопасность терапии оценивалась по частоте нежелательных явлений (НЯ); динамике жизненно важных показателей; динамике лабораторных параметров; ЭКГ; по результатам физикального обследования и по частоте прекращения терапии.

Статистический анализ

Выборочные параметры, приводимые в таблицах, имеют следующие обозначения: M — среднее, s — стандартное отклонение, n — объем анализируемой подгруппы, p — достигнутый уровень значимости. Критерий Шапиро — Уилка либо

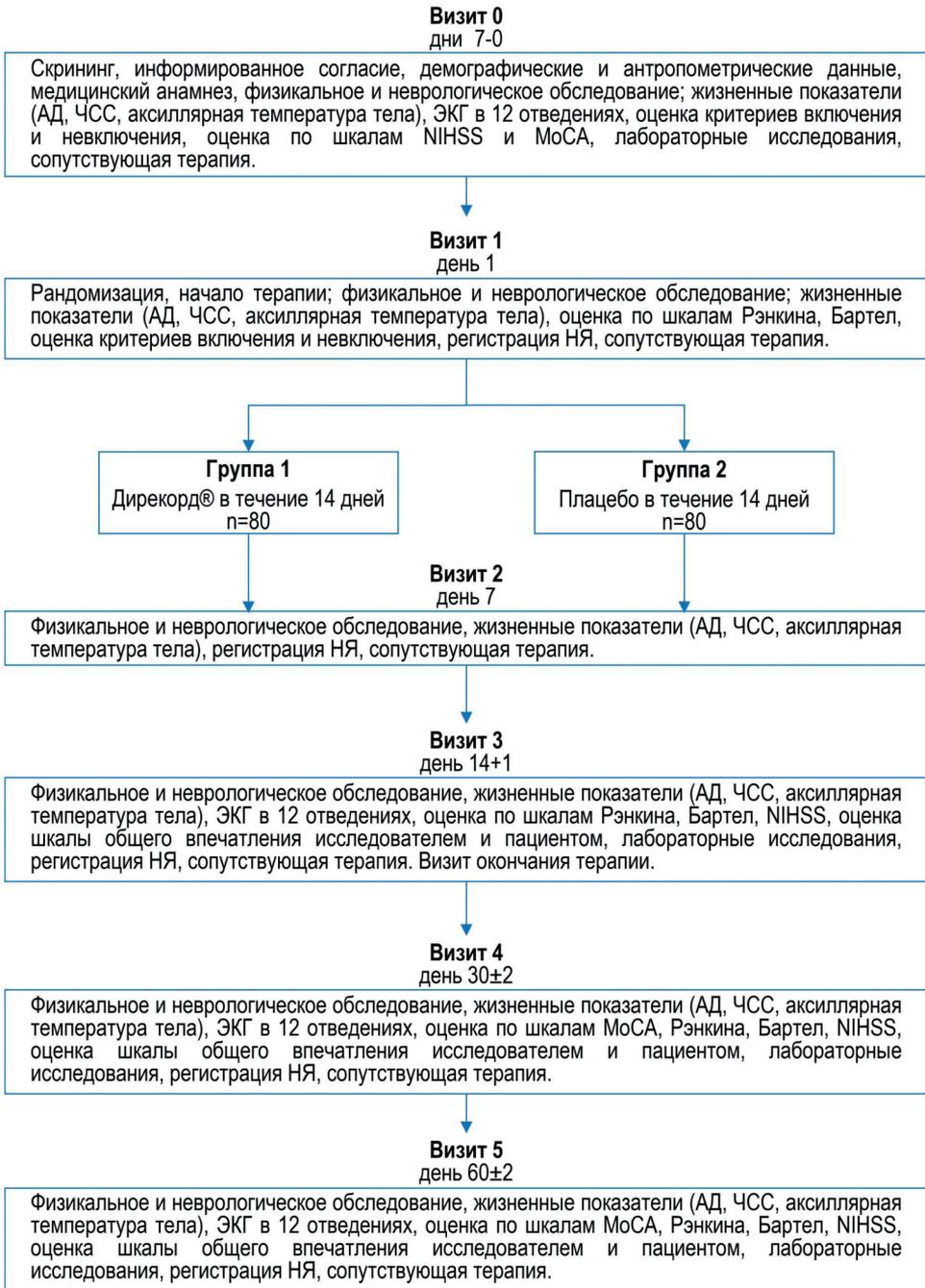


Рис. 1. План исследования.

Fig. 1. Study plan.

Колмогорова — Смирнова применялись для выбора параметрических или непараметрических методов анализа. При оценке эффективности терапии первичная точка анализировалась на основе статистической гипотезы, что терапия с применением исследуемого препарата не превосходит по эффективности терапию плацебо с помощью точного критерия Фишера. Сравнение по визитам между группами проводилось на основе критерия χ^2 Пирсона или точного критерия Фишера. Результаты всех вторичных показателей анализировались с помощью дисперсионного анализа ANOVA с повторяющимися измерениями с апостериорным тестом по методу Холма для множественных сравнений между группами. Критический уровень значимости принимался равным 5%. Статистический анализ проводился при помощи статистического пакета R 3.4.

Результаты исследований

Исходные характеристики пациентов суммированы в табл. 1. Критерий χ^2 не выявил статистически значимых различий между группами по распределению мужчин

и женщин ($p>0,05$). Дисперсионный анализ ANOVA не выявил статистически значимых различий между терапевтическими группами ($p>0,05$) ни по одному из следующих показателей: возраст, масса тела, рост и индекс массы тела (ИМТ). Сопутствующую терапию получали 80 (100%) пациентов группы исследуемого препарата и 80 (100%) пациентов группы препарата сравнения. После сбора анамнеза перенесённых и настоящих заболеваний пациента ни для одной из систем органов не зарегистрировано статистически значимых различий между группами с помощью точного критерия Фишера ($p>0,05$).

Анализ первичной конечной точки эффективности

В группе исследуемого препарата на терапию ответили 19 (23,7%) пациентов, а в группе плацебо — 7 (8,7%) пациентов (табл. 2). Однократное сравнение долей пациентов, ответивших на терапию, для двух групп с помощью точного критерия Фишера выявило статистически значимые различия ($p=0,017$). Таким образом, отвергается нулевая гипотеза о том, что терапия с применением исследуемого препа-

Таблица 1. Исходные характеристики пациентов

Table 1. Baseline characteristics of patients

Показатель	Группы	
	Дирекорд	Плацебо
Женщины / мужчины	28 / 52	34 / 46
Возраст, годы ($M\pm s$)	64,20 \pm 8,56	62,29 \pm 8,31
Масса тела, кг ($M\pm s$)	79,61 \pm 11,21	80,97 \pm 10,85
Рост, м ($M\pm s$)	1,71 \pm 0,08	1,71 \pm 0,08
Индекс массы тела, кг/м ² ($M\pm s$)	27,08 \pm 3,16	27,68 \pm 3,72

Таблица 2. Распределение долей пациентов, ответивших на проводимую терапию

Table 2. Distribution of proportions of patients who responded to the therapy

Показатель	Результат	Группы			
		Дирекорд		Плацебо	
		n	%	n	%
Пациент ответил на проводимую терапию	Нет	61	76,3	73	91,3
	Да	19	23,7	7	8,7

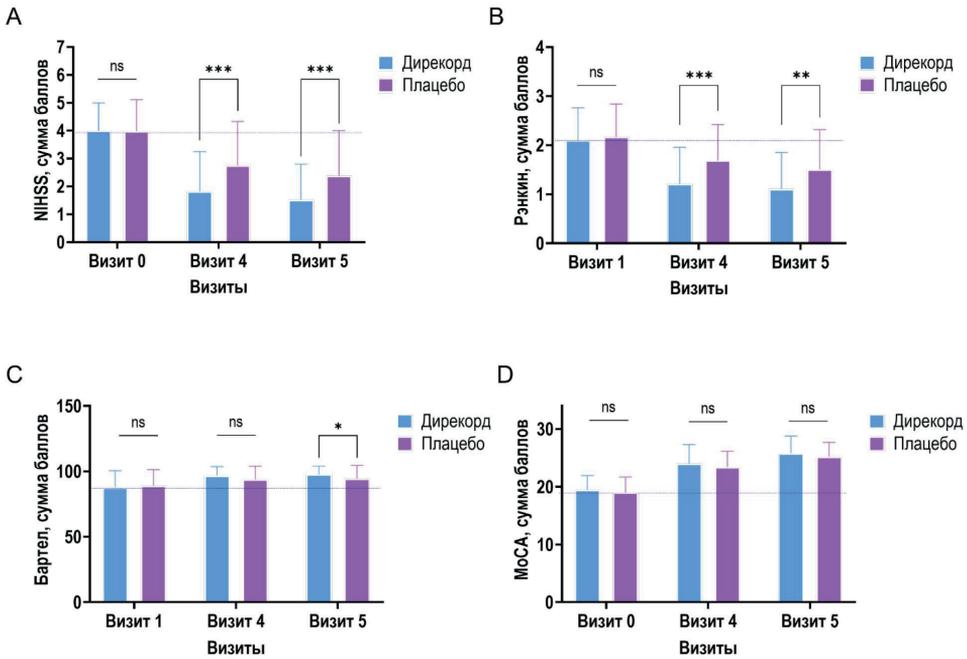


Рис. 2. Оценки по шкалам А) NIHSS, В) Рэнкина, С) Бартел и D) MoCA по визитам и терапевтическим группам ($M \pm s$). ns — $p > 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$ по сравнению с плацебо.

Fig. 2. A) NIHSS, B) Rankin, C) Barthel, and D) MoCA scores by visits and treatment groups ($M \pm s$). ns — $p > 0.05$; ** — $p < 0.01$; *** — $p < 0.001$ compared with Placebo.

рата не превосходит по эффективности терапию плацебо.

Анализ вторичных конечных точек эффективности

Двусторонний дисперсионный анализ ANOVA с повторяющимися измерениями выявил статистически значимое снижение средних значений оценок по шкале NIHSS от визита к визиту ($F=99,50$; $p < 0,0001$) при статистически значимом большем снижении в группе исследуемого препарата ($p=0,004$) по сравнению с плацебо. Среднее снижение оценок по шкале NIHSS к концу терапии составило $-2,45 \pm 1,42$ и $-1,60 \pm 1,32$ балла в группе исследуемого препарата и группе плацебо соответственно (рис. 2).

Двусторонний дисперсионный анализ ANOVA с повторяющимися измерениями выявил статистически значимое снижение средних значений оценок по шкале Рэнкина

от визита к визиту ($F=58,04$; $p < 0,0001$) и статистически значимое большее снижение в группе исследуемого препарата ($p=0,0357$) по сравнению с плацебо. Среднее снижение оценок по шкале Рэнкина к концу терапии составило $-0,99 \pm 0,81$ и $-0,66 \pm 0,84$ балла в группе исследуемого препарата и группе плацебо соответственно (рис. 2).

Двусторонний дисперсионный анализ ANOVA с повторяющимися измерениями выявил статистически значимое увеличение средних значений оценок индекса Бартел от визита к визиту ($F=27,33$; $p < 0,0001$) и тренд к большему повышению значений индекса в группе исследуемого препарата ($p=0,077$) по сравнению с плацебо. Среднее повышение оценок по шкале Бартел к концу терапии составило $9,94 \pm 11,69$ и $5,31 \pm 9,26$ балла в группе

исследуемого препарата и группе плацебо соответственно (рис. 2).

Двусторонний дисперсионный анализ ANOVA с повторяющимися измерениями выявил статистически значимое увеличение средних значений оценок по шкале MoCA от визита к визиту ($F=210,52$; $p<0,0001$), но не выявил различий между группами по фактору терапии ($p=0,974$). Среднее повышение оценок к концу терапии составило $6,36\pm 2,78$ и $6,24\pm 2,79$ балла в группе исследуемого препарата и группе плацебо соответственно (рис. 2).

Точный критерий Фишера выявил статистически значимое отличие между группами по распределению оценок как исследователем (CGI-I), так и пациентами (PGI-I) на каждом из визитов по соответствующим шкалам общего клинического впечатления (табл. 3).

Оценка безопасности

Всего в исследовании было отмечено 3 НЯ у 3 (3,75%) пациентов в группе исследуемого препарата, 6 НЯ у 6 (7,5%) пациентов в группе плацебо (табл. 4). Анализ с использованием точного критерия Фишера не выявил статистически значимой разницы между группами ($p=0,495$). Случаев смерти зарегистрировано не было.

В группе исследуемого препарата были зарегистрированы следующие НЯ: местная реакция — 1 (1,25%), острое респираторное заболевание — 1 (1,25%) и цефалгия — 1 (1,25%). В группе плацебо были зарегистрированы следующие НЯ: боль в левом плечевом суставе — 1 (1,25%), головокружение — 1 (1,25%), местная реакция — 1 (1,25%), нарушение сна — 1 (1,25%), ОРВИ — 1 (1,25%) и цефалгия — 1 (1,25%).

Анализ лабораторных показателей не выявил различий между терапевтическими группами. Средние изменения показателей

Таблица 3. Распределение оценок исследователем (CGI-I) и пациентами (PGI-I) по шкале общего клинического впечатления по визитам и терапевтическим группам

Table 3. Distribution of investigator (CGI-I) and patient (PGI-I) scores on the Global Clinical Impression Scale by visits and treatment groups

Группа	Результат	Визит 3		Визит 4		Визит 5	
		CGI-I	PGI-I	CGI-I	PGI-I	CGI-I	PGI-I
Дирекорд	Выраженное улучшение	19	20	34	34	36	35
	Умеренное улучшение	37	31	32	28	20	20
	Легкое улучшение	21	27	12	14	18	17
	Нет изменений	3	2	2	4	6	8
	Легкое ухудшение	0	0	0	0	0	0
	Умеренное ухудшение	0	0	0	0	0	0
	Выраженное ухудшение	0	0	0	0	0	0
Плацебо	Выраженное улучшение	7	8	8	12	13	18
	Умеренное улучшение	23	18	30	24	31	23
	Легкое улучшение	28	27	27	20	22	18
	Нет изменений	22	27	15	24	14	21
	Легкое ухудшение	0	0	0	0	0	0
	Умеренное ухудшение	0	0	0	0	0	0
	Выраженное ухудшение	0	0	0	0	0	0
p (между группами)		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,009

Таблица 4. Число и доля пациентов с НЯ в терапевтических группах
Table 4. Number and proportion of patients with AE in treatment groups

НЯ	Дирекорд		Группы Плацебо		Всего	
	п	%	п	%	п	%
Нет	77	96,25	74	92,50	151	94,37
Есть	3	3,75	6	7,50	9	5,63

общего анализа крови и биохимического анализа крови за 14 и 30 дней исследования анализировали однофакторным дисперсионным анализом ANOVA с терапией в качестве фактора. Анализ не выявил статистически значимых различий между группами ($p > 0,05$). Точный критерий Фишера показал, что распределение оценок норма/отклонения для значений показателей анализа мочи по визитам не отличалось статистически значимо между группами ($p > 0,05$).

Анализ жизненных показателей не выявил различий между терапевтическими группами. Двусторонний дисперсионный анализ ANOVA с повторяющимися измерениями выявил статистически значимое снижение систолического ($p < 0,0001$) и диастолического давления в ходе исследования ($p = 0,001$), но не различия между группами по фактору терапии ($p > 0,05$). ANOVA не выявил статистически значимых изменений частоты сердечных сокращений (ЧСС) в ходе исследования ($p > 0,05$) и значимых отличий между группами ($p > 0,05$). Точный критерий Фишера не выявил ни на одном из визитов значимых различий в распределении оценок норма / незначимые изменения результатов ЭКГ в 12 отведениях между группами ($p > 0,05$).

Распределение оценок норма / незначимые изменения / значимые изменения по результатам физикального осмотра и неврологического обследования анализировалось при помощи точного критерия Фишера. Анализ выявил статистически значимое отличие между группами только на визите 3 ($p = 0,022$), когда в группе препарата на 10% увеличилось число пациентов

с оценкой норма против 1,25% в группе плацебо, но не на остальных визитах ($p > 0,05$).

Обсуждение результатов

Различают четыре временных периода после инсульта: сверхострую, острую, подострую и хроническую фазы. Гибель вещества мозга в сверхострой фазе происходит в первые часы после инсульта из-за начальной потери кровотока и массового выброса глутамата нейронами, приводящего к эксайтотоксичности. Глутамат вызывает гиперактивацию ионотропных N-метил-D-аспаратных (NMDA) рецепторов, что ведет к массовому и необратимому входу ионов Ca^{2+} в нейрон, т.н. «кальциевой дисрегуляции», за чем следует деполяризация митохондрий, нарушение синтеза аденозинтрифосфата (АТФ), окислительный стресс и в результате прогрессирующая гибель нейронов [10]. Глутаматная эксайтотоксичность вызывает острую нейрональную инсулиновую резистентность, снижая активность инсулиновых рецепторов и нижележащих киназ каскада инсулиновой сигнализации, таких как Akt, mTOR и GSK-3 β [9]. Постинсультная инсулиновая резистентность снижает способность мозга к восстановлению, что предопределяет плохой неврологический и функциональный клинический результат в будущем [1–3, 7]. Поэтому использование препарата Дирекорд, обладающего свойствами нейронального инсулин-сенситайзера, в лечении ишемического инсульта было обоснованным с точки зрения текущих представлений о молекулярных механизмах инсульта в восстановительном периоде.

Выбор периода от 3 недель до 2 мес. после инсульта для исследования эффективности препарата был обусловлен тем, что именно в подострой фазе инсульта мозг имеет максимальную способность к самопроизвольному восстановлению через реорганизацию нейрональных сетей и усиление процессов нейрогенеза и синаптогенеза, т.к., начиная уже с 3 мес., инсульт переходит в хроническую фазу, когда мозг теряет способность к самопроизвольному восстановлению, и реабилитация пациентов требует огромных усилий [4].

В настоящем исследовании III фазы было показано, что препарат Дирекорд, нейрональный инсулин-сенситайзер, эффективен для лечения ишемического инсульта в раннем восстановительном периоде. При внутримышечном введении в дозе 600 мг/сут препарат статистически значимо снижал неврологический дефицит по шкале NIHSS, снижал нарушения жизнедеятельности по шкале Рэнкина, повышал уровень социальной адаптации и качества жизни пациента по индексу функциональной активности Бартел. Препарат также существенно повышал когнитивные функции по шкале MoCA, но уровня статистически значимого отличия от плацебо достигнуто не было из-за быстрого прогресса этого показателя в обеих группах в раннем восстановительном периоде. Дирекорд статистически значимо превосходил плацебо по шкале общего клинического впечатления пациента (PGI-I) и исследователя (CGI-I).

Исследуемый препарат имеет высокий профиль безопасности при лечении ишемического инсульта в раннем восстановительном периоде. В ходе исследования было отмечено 9 НЯ, из них 3 НЯ (3,75%) в группе исследуемого препарата и 6 НЯ (7,5%) — в группе плацебо при отсутствии статистически значимой разницы между группами. Все нежелательные явления, возникшие у пациентов в ходе исследования, были легкой степени тяжести и завершились к моменту окончания исследования. Ни одно

из НЯ не потребовало отмены исследуемых препаратов или изменения режима терапии. Случаев смерти зарегистрировано не было. Анализ лабораторных показателей и жизненных показателей не выявил различий между терапевтическими группами.

Ранее эффективность инсулин-сенситайзеров метформина и пиоглитазона была продемонстрирована в профилактике ишемического инсульта. Большое клиническое исследование (n=1919) показало, что применение метформина до инсульта снижало тяжесть инсульта при поступлении по шкале NIHSS, нарушение жизнедеятельности по шкале Рэнкина и снижало смертность пациентов по сравнению с контролем [14]. Метаанализ 2017 г. показал, что в популяции, включавшей пациентов с инсулиновой резистентностью, пре-диабетом и диабетом 2 типа (n=4980), применение пиоглитазона значимо снижало риск повторного инсульта [6]. Пиоглитазон снижал риск повторного инсульта у пациентов с пре-диабетом (n=2885) [13], а также снижал риск транзиторной ишемической атаки и повторного инсульта у пациентов без диабета (n=3876) с выраженной инсулиновой резистентностью и историей ишемического инсульта [5]. Однако эффективность инсулин-сенситайзеров в лечении инсульта не была продемонстрирована ранее в рандомизированных клинических испытаниях.

В целом настоящее исследование показывает, что применение инсулин-сенситайзеров в раннем восстановительном периоде может стать новым перспективным подходом к улучшению неврологических и функциональных показателей у пациентов, перенесших ишемический инсульт.

Выводы

1. Результаты многоцентрового рандомизированного двойного слепого плацебо-контролируемого в параллельных группах исследования III фазы эффективности и безопасности лекарственного препарата Дирекорд, действующее вещество — ди-

холинсукцинат, позволяют утверждать, что препарат статистически и клинически значимо превосходит плацебо при двухнедельной внутримышечной терапии в дозе 600 мг/сут у пациентов с ишемическим инсультом в каротидной системе в раннем восстановительном периоде.

2. Профиль безопасности препарата Дирекорд при двухнедельной внутримышечной терапии в дозе 600 мг/сут у пациентов с ишемическим инсультом в каротидной системе в раннем восстановительном периоде не отличается статистически значимо от такового для плацебо.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Åberg D., Åberg N.D., Jood K., Holmegaard L., Redfors P., Blomstrand C., Isgaard J., Jern C., Svensson J. Homeostasis model assessment of insulin resistance and outcome of ischemic stroke in non-diabetic patients — a prospective observational study. *BMC Neurol.* 2019;19(1):177. DOI: 10.1186/s12883-019-1406-3.
2. Ago T., Matsuo R., Hata J., Wakisaka Y., Kuroda J., Kitazono T., Kamouchi M. Insulin resistance and clinical outcomes after acute ischemic stroke. *Neurology.* 2018;90(17):1470–e1477. DOI: 10.1212/WNL.0000000000005358.
3. Jing J., Pan Y., Zhao X., Zheng H., Jia Q., Mi D., Chen W., Li H., Liu L., Wang C., He Y., Wang D., Wang Y., Wang Y. Insulin Resistance and Prognosis of Nondiabetic Patients with Ischemic Stroke: The ACROSS-China Study (Abnormal Glucose Regulation in Patients with Acute Stroke Across China). *Stroke.* 2017;48(4):887–893. DOI: 10.1161/STROKEAHA.116.015613.
4. Joy M.T., Carmichael S.T. Encouraging an excitable brain state: mechanisms of brain repair in stroke. *Nat. Rev. Neurosci.* 2021;22(1):38–53. DOI: 10.1038/s41583-020-00396-7.
5. Kernan W.N., Viscoli C.M., Furie K.L., Young L.H., Inzucchi S.E., Gorman M., Guarino P.D., Lovejoy A.M., Peduzzi P.N., Conwit R., Brass L.M., Schwartz G.G., Adams H.P. Jr, Berger L., Carolei A., Clark W., Coull B., Ford G.A., Kleindorfer D., O’Leary J.R., Parsons M.W., Ringleb P., Sen S., Spence J.D., Tanne D., Wang D., Winder T.R.; IRIS Trial Investigators. Pioglitazone after Ischemic Stroke or Transient Ischemic Attack. *N. Engl. J. Med.* 2016;374(14):1321–1331. DOI: 10.1056/NEJMoa1506930.
6. Lee M., Saver J.L., Liao H.W., Lin C.H., Ovbiagele B. Pioglitazone for Secondary Stroke Prevention: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Stroke.* 2017;48(2):388–393. DOI: 10.1161/STROKEAHA.116.013977.
7. Li S., Yin C., Zhao W., Zhu H., Xu D., Xu Q., Jiao Y., Wang X., Qiao H. Homeostasis model assessment of insulin resistance in relation to the poor functional outcomes in nondiabetic patients with ischemic stroke. *Biosci. Rep.* 2018;38(3):BSR20180330. DOI: 10.1042/BSR20180330.
8. Pomytkin I., Costa-Nunes J.P., Kasatkin V., Veniaminova E., Demchenko A., Lyundup A., Lesch K.P., Ponomarev E.D., Strekalova T. Insulin receptor in the brain: Mechanisms of activation and the role in the CNS pathology and treatment. *CNS Neurosci. Ther.* 2018;24(9):763–774. DOI: 10.1111/cns.12866.
9. Pomytkin I., Krasil’nikova I., Bakaeva Z., Surin A., Pinelis V. Excitotoxic glutamate causes neuronal insulin resistance by inhibiting insulin receptor/Akt/mTOR pathway. *Mol. Brain.* 2019;12(1):112. DOI: 10.1186/s13041-019-0533-5.
10. Qin C., Yang S., Chu Y.H., Zhang H., Pang X.W., Chen L., Zhou L.Q., Chen M., Tian D.S., Wang W. Signaling pathways involved in ischemic stroke: molecular mechanisms and therapeutic interventions. *Signal Transduct. Target Ther.* 2022;7(1):215. DOI: 10.1038/s41392-022-01064-1.
11. Spence J.D., Viscoli C.M., Inzucchi S.E., Dearborn-Tomazos J., Ford G.A., Gorman M., Furie K.L., Lovejoy A.M., Young L.H., Kernan W.N.; IRIS Investigators. Pioglitazone Therapy in Patients With Stroke and Prediabetes: A Post Hoc Analysis of the IRIS Randomized Clinical Trial. *JAMA Neurol.* 2019;76(5):526–535. DOI: 10.1001/jamaneurol.2019.0079.
12. Storozheva Z.I., Proshin A.T., Sherstnev V.V., Storozhevykh T.P., Senilova Y.E., Persiyantseva N.A., Pinelis V.G., Semenova N.A., Zakharova E.I., Pomytkin I.A. Dicholine salt of succinic acid, a neuronal insulin sensitizer, ameliorates cognitive deficits in rodent models of normal aging, chronic cerebral hypoperfusion, and beta-amyloid peptide-(25-35)-induced amnesia. *BMC Pharmacol.* 2008;8:1. DOI: 10.1186/1471-2210-8-1.
13. Storozhevykh T.P., Senilova Y.E., Persiyantseva N.A., Pinelis V.G., Pomytkin I.A. Mitochondrial respiratory chain is involved in insulin-stimulated hydrogen peroxide production and plays an integral role in insulin receptor autophosphorylation in neurons. *BMC Neurosci.* 2007;8:84. DOI: 10.1186/1471-2202-8-84.
14. Westphal L.P., Widmer R., Held U., Steigmiller K., Hametner C., Ringleb P., Curtze S., Martinez-Majander N., Tiainen M., Nolte C.H., Scheitz J.F., Erdur H., Polymeris A.A., Traenka C., Eskandari A., Michel P., Heldner M.R., Arnold M., Zini A., Vandelli L., Coutinho J.M., Groot A.E., Padjen V., Jovanovic D.R.,

Bejot Y., Brenière C., Turc G., Seners P., Pezzini A., Magoni M., Leys D., Gilliot S., Scherrer M.J., Kägi G., Luft A.R., Gensicke H., Nederkoorn P., Tatlisumak T., Engelter S.T., Wegener S.; Thrombolysis in Ischemic

Stroke Patients (TRISP) Study Group. Association of prestroke metformin use, stroke severity, and thrombolysis outcome. *Neurology*. 2020;95(4):e362–e373. DOI: 10.1212/WNL.0000000000009951.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Помыткин Игорь Анатольевич*, к.х.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: ipomytkin@mail.ru

Igor A. Pomytkin*, Cand. Sci. (Chem.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: ipomytkin@mail.ru

Писарев Владимир Викторович, к.х.н., ООО «Научно-производственный центр Пробиотек»;
e-mail: vladimir.pisarev@probiotech.ru

Vladimir V. Pisarev, Cand. Sci. (Chem.), Scientific and Production Center Probiotech;
e-mail: vladimir.pisarev@probiotech.ru

Меркулов Михаил Евгеньевич, ООО «Научно-производственный центр Пробиотек»;
e-mail: mikhail.merkulov@probiotech.ru

Mikhail E. Merkulov, Scientific and Production Center Probiotech;
e-mail: mikhail.merkulov@probiotech.ru

Лукиных Лия Викторовна, ГБУЗ Ленинградской области «Всеволожская клиническая межрайонная больница»;
e-mail: Liya.lukinyh@mail.ru

Liya V. Lukinykh, Vsevolzhsk Clinical Inter-district Hospital;
e-mail: Liya.lukinyh@mail.ru

Моржухина Марина Владимировна, ГБУЗ Ярославской области «Клиническая больница № 2»;
e-mail: morjuhi@rambler.ru

Marina V. Morzhukhina, Yaroslavl Clinical Hospital No. 2;
e-mail: morjuhi@rambler.ru

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

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

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

ВНИМАНИЮ АВТОРОВ

Журнал «Биомедицина» принимает для публикации рукописи оригинальных научных работ обзорного, экспериментального и учебно-методического плана, не публиковавшиеся ранее в других изданиях.

Приоритетные области и задачи научных исследований:

- разработка и внедрение новых биомедицинских технологий;
- биологическое, математическое и релевантное моделирование живых систем;
- генетическая, микробиологическая, экологическая стандартизация лабораторных животных в соответствии с рекомендациями GLP и российскими нормативами;
- доклинические, клинические испытания и экспертиза лекарственных и иммунобиологических средств;
- создание ДНК-конструкций и новых методов генетической модификации с целью получения трансгенных, нокаутных и гуманизированных видов животных-моделей;
- проблемы репрезентативности, воспроизводимости и экстраполяции на человека данных, полученных в биомедицинских экспериментах.

С марта 2010 года журнал «Биомедицина» включен в перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание учёной степени доктора наук и ученой степени кандидата наук (Перечень ВАК при Минобрнауки России).

В соответствии с решением ВАК от 15 июня 2017 года № 1-пл/1 (Приложение 2) предпочтение при публикации в журнале имеют научные труды, выполненные по группам специальностей *медико-биологические науки, физиология, клиническая медицина, ветеринария и зоотехния*.

Рубрикация журнала, актуальные разделы, требования к оформлению представляемых рукописей, порядок рецензирования и сроки опубликования работ отражены в Правилах направления, рецензирования и опубликования рукописей научных работ в журнале «Биомедицина».

Во исполнение вышеуказанного решения ВАК при Минобрнауки России учредитель научного журнала «Биомедицина» — ФГБУН НЦБМТ ФМБА России — обеспечивает проверку представляемых к опубликованию рукописей на на-

личие неправомерных заимствований путём получения от авторов и организаций, направляющих рукопись научной работы в редакцию, информации в сопроводительных документах о нижеследующем:

- подтверждают, что работа нигде ранее не была опубликована, не направлялась и не будет направляться для опубликования в другие научные издания;
- гарантируют соблюдение авторских прав;
- несут ответственность за неправомерное использование в научной статье объектов интеллектуальной собственности, объектов авторского права в полном объёме в соответствии с действующим законодательством РФ;
- передают на неограниченный срок учредителю журнала неисключительные права на использование научной статьи путём размещения полнотекстовых сетевых версий номеров на сайте журнала в информационно-телекоммуникационной сети Интернет;
- гарантируют возможность опубликования результатов работы в открытой печати;
- выражают безусловное согласие с правилами подготовки рукописи к изданию, утверждёнными редакцией журнала «Биомедицина», опубликованными и размещёнными на официальном сайте журнала.

В случае обнаружения нарушений данных гарантий и обязательств наступает полное прекращение дальнейшего сотрудничества, а также иная ответственность, предусмотренная законами РФ.

Рукописи, не отвечающие перечисленным требованиям, не рассматриваются и не возвращаются. Редакция оставляет за собой право принимать решение о публикации рукописи, производить редакционные изменения и сокращения, стилистическую правку, а также переносить статью в другой раздел или номер журнала.

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

Полная информация представлена на официальном сайте журнала <http://journal.scbmt.ru> и на сайте ФГБУН НЦБМТ ФМБА России <http://www.scbmt.ru> (раздел “Журнал «Биомедицина»”).

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

Филиал «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России

Филиал «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России (до 2002 года — Питомник лабораторных животных Столбовая РАМН) ведёт свою историю с 1929 года. По настоящее время питомник обеспечивает своих потребителей конвенциональными животными высокого качества, контролируемые по генетическим, экологическим, физиологическим, морфологическим признакам и состоянию здоровья. Все животные сертифицированы в соответствии с Положением о контроле качества лабораторных животных, питомников и экспериментально-биологических клиник (вивариев).

С Филиалом сотрудничает множество потребителей лабораторных животных из России и стран СНГ, в т.ч. научно-исследовательские учреждения ФМБА, РАН, Минздрава и Минобороны России, учебные заведения медико-биологического профиля, производители и испытатели лекарственных средств.

Филиал «Столбовая» предлагает следующих животных:

1. Инбредные мыши линий:

- **BALB/c** (окраска шерсти: белая, альбиносы; генотип: b, c, d) — используются во всех медико-биологических исследованиях, характеризуются высокой частотой опухолей легких, яичников и надпочечников, лимфосарком, служат моделью для изучения потенциальных фибринолитических компонентов, лизисов и процессов формирования тромбозов, рекомендуются при изучении нарушений репродуктивной функции, обусловленной микоплазмами;

- **CBA/lac** (окраска шерсти: агути; генотип: k) — используются в радиологии, для изучения спонтанных опухолей печени, могут быть рекомендованы как долгожители, являются хорошей моделью для изучения зависимости течения беременности от возраста;

- **C57BL/6J** (окраска шерсти: чёрная; генотип: a, b) — используются практически во всех медицинских и биологических исследованиях, в т.ч. для изучения скелетных аномалий, дефектов развития головы и глаз, являются стандартной линией для поддержания мутаций, применяются в качестве эталона для сравнения с особенностями других линий в исследовании культур тканей, загрязнения атмосферы, гематологии, химиотерапии рака, радиации, питания;

- **DBA/2J** (окраска шерсти: светло-коричневая; генотип: a, b, d) — особенно широко используются в онкологических, иммунологических, нейробиологических исследованиях.

II. Трансгенные мыши линий:

- **B10.GFP** — зелёный флуоресцирующий белок (GFP) используется в качестве прижизненного маркера, позволяющего наблюдать за локализацией и перемещением изучаемых белков в живых функционирующих клетках и выяснить их биологическую функцию;

- **NAT1hom, Nat2hom** — применима для изучения и описания ацетиляторного полиморфизма генов NAT1hom, NAT2hom человека в исследовании фармакотоксикологических свойств и эффективности препаратов.

III. Межлинейные гибриды мышей:

- гибриды первого поколения (F1) генетически и фенотипически однородны, обладают большей устойчивостью к условиям внешней среды, чем животные инбредных линий, наследуют генетические особенности родительских линий, но не сохраняют всех их характеристик. Ответ организма на экспериментальное воздействие — однотипный и стабильный, воспроизводимостью результатов исследований — высокая. Особенно широко используются в исследованиях онкологии, радиации.

IV. Аутбредные животные (генетически контролируемые закрытые колонии нелинейных животных):

- **мыши линии ICR** (окраска шерсти: белая) — гетерозиготны по не определённому числу генов, используется для оценки безопасности лекарственных препаратов, биологически активных добавок, косметических средств;

- **крысы Wistar** (окраска шерсти: белая, альбиносы) — используются в онкологических исследованиях, тератологии, для изучения проблем питания и старения;

- **хомяки сирийские** (окраска шерсти: умеренно желто-коричневая) — используются для наработки вакцин в токсикологии, для изучения поведенческих реакций, канцерогенеза;

- **морские свинки** (альбиносы и пестрые);

- **кролики** (порода советская шиншилла).



142350, Московская обл., Чеховский р-н, п. Столбовая, ул. Мира, д. 1а

Тел.: 8(495)996-59-52; 8(496)726-95-15

Закупка животных: 8(964)768-25-40; 8(916)021-02-50; 8(916)021-00-76

E-mail: biomaus@mail.ru

