

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

ISSN 2713-0428 (online)

БИОМЕДИЦИНА

SCIENTIFIC JOURNAL

JOURNAL BIOMED

Том (Vol.) 20

2024

3E



ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий
ФМБА России»

БИОМЕДИЦИНА

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Издается с 2005 г.
4 выпуска в год

2024, Том 20, № 3Е

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

JOURNAL BIOMED

SCIENTIFIC JOURNAL

Published since 2005.
Quarterly

2024, Vol. 20, No. 3E

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

■ Главный редактор

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

■ Заместители главного редактора

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

Помыткин Игорь Анатольевич, к.х.н.

■ Ответственный секретарь

Алимкина Оксана Владимировна

■ Члены редакционного совета

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

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

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

Влахов Витан, д.м.н., проф., акад. 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., акад. РАН (Москва, Россия)

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

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

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

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

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

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

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

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

Николенко Владимир Николаевич, д.м.н., проф. (Москва, 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., акад. РАН (Москва, Россия)

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

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

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

Хритинин Дмитрий Фёдорович, д.м.н., проф., акад. 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., акад. РАЕН (Санкт-Петербург, Россия)

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

БИОМЕДИЦИНА

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 «МЕДИАКОЛОР» 127273, Москва, Сигнальный пр-д, 19, стр. 1
Дата выхода в свет:	01.11.2024

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)
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.), Acad. 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)
Aleksandr E. Kuznetsov, Dr. Sci. (Tech.), Prof. (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)
Vladimir N. Nikolenko, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Moscow, 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. Safronenko, 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., Acad. 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

Biomeditsina

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:	MediaColor LLC 127273, Russian Federation, Moscow, Signalny proezd, 19
Publication date:	01.11.2024

■ МЕТОДЫ И ТЕХНОЛОГИИ БИМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Ю.Е. Антипова, К.Т. Еримбетов, О.В. БуюклинскаяРазработка клатратного комплекса 3-(2-фенилэтил)-2-тиоксо-1,3-тиазолидин-4-она с β -циклодекстрином и изучение его противоопухолевой активности14**В.В. Быков, А.А. Вологжаникова, М.В. Трунилина, Т.А. Кудряшов,****Ю.С. Лаптева, А.С. Соколов**Определение оптимального диапазона температур функционирования метионин аминопептидазы из *Thermus thermophilus*20**Е.В. Ганцгорн, А.В. Сафроненко, В.И. Полякова, Р.М. Манвелян, А.А. Балоян,****И.М. Маллеев, Д.Д. Калашников**

Эффективность и безопасность современных гемостатиков на основе хитозана и каолина25

А.С. Гладчук, П.Н. Вариошкин, Е.Г. Батоцыренова, Я.К. Калниня,**Е.А. Золотоверхая, А.В. Андреева, Е.П. Подольская**

О применении технологии Ленгмюра для профилирования свободных жирных кислот методом масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией30

Н.А. Горячева

Ортотопическая модель глиобластомы человека35

Ю.В. Гурман, Н.С. Тропская, Е.В. Клычникова

Метаболическая адаптация при длительной пищевой депривации38

В.А. Езерский, Е.М. Колоскова

Зависимость антительного ответа молодняка овец от способа иммунизации рекомбинантным миостатином42

А.М. Зубалий, М.М. Гусева

Подходы к изучению особенностей пищеварения кабарги сибирской в условиях питомника49

О.Б. Жукова, Е.М. Колоскова

Иммунизация ягнят рекомбинантным миостатином влияет на показатели роста54

А.М. Маноян, А.В. Мачулин, Т.Т. Папазян, О.Е. Иванова, А.Н. ПанинСоздание синергического синбиотика на основе консорциума штаммов лактобацилл *Limosilactobacillus fermentum* 3872, *Ligilactobacillus salivarius* 7247 и пребиотика Актиген для профилактики сальмонеллёза у человека и сельскохозяйственных животных59**А.С. Мелехова, Ю.Ю. Ивницкий, К.А. Краснов, А.В. Бельская**

Экспериментальные модели для скрининга медикаментозных средств первой помощи при судорожном синдроме неустановленной этиологии65

Е.В. Панина, В.Н. Каркищенко, К.С. Остренко, Д.В. Петров, А.Е. Сорочан Морфофункциональная характеристика печени и почек <i>Chinchilla lanigera</i> на фоне применения воды, обогащённой молекулярным водородом	70
И.А. Помыткин, М.Т. Гасанов, В.Н. Каркищенко, М.С. Нестеров, Ю.В. Фокин, Н.В. Петрова, О.В. Алимкина, Н.Н. Каркищенко Роль технологических инноваций в создании новых лекарственных средств на основе мускуса кабарги	77
В.А. Приходько, Т.М. Матузок, Н.О. Селизарова, С.В. Оковитый Сравнительная характеристика влияния хлоралгидрата и трибромэтанола на электронейромиографические параметры у мышей	89
М.Ю. Раваева, И.В. Черетаев, Е.Н. Чуян, М.В. Нагорская, П.А. Галенко-Ярошевский, А.В. Зеленская, И.С. Миронюк, Э.Р. Джелдубаева Модификация показателей сердечно-сосудистой системы крыс в модели ишемии-реперфузии с помощью электромагнитного излучения крайне высокой частоты . . .	94
О.И. Степанова, Р.А. Клёсов, Х.Х. Семёнов, И.Б. Алчинова, А.Б. Черепов, А.А. Метёлкин, М.Ю. Карганов, А.О. Никольская, Н.А. Онищенко, Ю.Б. Басок Динамика изменения окислительного метаболизма в тканях прогнозирует тяжесть нарушения в системе клеток крови и клеток костного мозга у мышей с моделью сахарного диабета 2-го типа	107
Н.С. Тропская, Ю.В. Гурман, К.В. Заторкина Изучение кровотока в желудке и тонкой кишке методом ультразвуковой флуометрии в эксперименте	113
О.Б. Устинникова, И.М. Щербаченко, О.Н. Колесникова, Д.Д. Макарищева, Ю.Е. Исакина, О.Б. Рунова Перспективные вопросы оценки физико-химических показателей качества иммунобиологических лекарственных препаратов в условиях формирования регуляторной системы ЕАЭС	117
А.В. Шарабанов, Е.Г. Батоцыренова, В.А. Кашуро, М.Т. Гасанов Фармакологическая коррекция пептидными препаратами физической работоспособности самцов крыс при изменении светового режима.	129
■ РЕЛЕВАНТНОЕ И АЛЬТЕРНАТИВНОЕ БИОМОДЕЛИРОВАНИЕ	
А.В. Бервинова, В.А. Паликов, И.А. Дьяченко, Р.Р. Амиров, Н.Б. Павлов, А.Т. Логунов, А.Н. Мурашёв Биомоделирование декомпрессионной болезни у крыс	135
В.А. Паликов, Н.Б. Павлов, Р.Р. Амиров, А.М. Исмаилова, С.О. Афанасьева, Е.С. Михайлов, А.В. Бервинова, И.А. Дьяченко, А.Т. Логунов, А.Н. Мурашёв Применение гипероксической подогретой гелий-кислородной смеси в экспериментальной модели церебральной артериальной воздушной эмболии	140

М.В. Шинелев

Моделирование гипобарической и гемической гипоксий 147

■ ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В БИОМЕДИЦИНЕ**Н.А. Анисимова, А.О. Ежова**

Изучение гипогликемизирующей активности комбинаций малобена с синтетическими противодиабетическими препаратами на стрептозоциновой модели сахарного диабета 151

Н.А. Бороздина, И.Н. Гладких

Формирование диабетической нейропатии у мышей C57BL/6 на фоне высокожировой диеты 156

П.А. Голубинская, А.С. Пикина, Е.С. Ручко, Е.В. Коженевская, А.Д. Поспелов, А.А. Бабаев, В.А. Иванов, Ю.А. Беспятых, Л.С. Шнайдер, А.В. Еремеев

Исследование биораспределения тканеинженерного продукта на основе хондроцитов человека различного происхождения при имплантации мышам линии Balb/c Nude 160

Р.А. Далевич, И.А. Дьяченко

Модель остеоартрита, индуцированного моноиодацетатом, у лабораторных животных 176

Е.М. Евгеньева, А.В. Черномордова, С.В. Оковитый, А.Н. Куликов

Моделирование сердечной недостаточности при помощи циклофосфида 182

Д.Ю. Ивкин, М.В. Краснова, Е.Д. Семивеличенко, А.А. Карпов, В.Е. Ковансков, С.В. Оковитый

Сравнительная эффективность этмабена и эмпаглифлозина в моно- и комбинированной терапии экспериментальной хронической сердечной недостаточности 187

К.С. Качалов, А.С. Соломина, А.В. Родина

Репродуктивные нарушения у матерей и потомства крыс при моделировании гестационного диабета высококалорийной диетой в сочетании с тилоксаполом 191

Т.М. Матузок, В.А. Приходько, В.Е. Карев, О.В. Буюклинская, С.В. Оковитый

Патоморфологические изменения в тканях печени и скелетных мышц у мышей линии db/db разных возрастных групп 197

В.М. Павлов, А.Ю. Федотова

Изучение стресс-протекторных свойств пептида АРНСЗ в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» на мышах ICR 202

Н.А. Перепеченова, Е.А. Туховская, А.М. Исмаилова, Э.Р. Шайхутдинова, Г.А. Слащева, Е.С. Садовникова, И.А. Дьяченко, А.Н. Мурашёв

Антигипертензивный эффект Таксифолина на модели возрастной гипертензии 206

Е.Д. Семивеличенко, А.С. Романовский, А.В. Еремин, С.М. Напалкова, О.В. Буюклинская Оценка ранозаживляющего эффекта гидрогелей на модели экспериментального ожога у грызунов	211
Н.С. Стрельникова, О.М. Розанова, Е.Н. Смирнова, Т.А. Белякова, Е.А. Кузнецова Влияние ксилазин-золетиловой анестезии на выживаемость мышей при воздействии излучений с разными значениями линейной потери энергии	216
Н.В. Трусов, А.С. Балакина, К.В. Мжельская, Н.С. Никитин, И.В. Аксенов, Г.В. Гусева, В.А. Тутельян Влияние ресвератрола на развитие неалкогольной жировой болезни печени у крыс, получавших высокожировой высокофруктозный рацион	221
А.Ю. Федотова, В.М. Павлов Изучение анксиолитических свойств антагониста TRPV1 рецепторов в тесте «Тёмная/светлая камера» на мышах ICR	229
М.П. Шевелёва, Е.И. Дерюшева, Е.Л. Немашкалова, А.А. Вологжанникова, А.А. Назипова, Е.А. Литус Изучение взаимодействия β -амилоидного пептида с инсулином детемир методами биослойной интерферометрии и молекулярного моделирования	233
■ БИОМЕДИЦИНСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ В КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ	
Н.С. Бендерский, А.В. Сафроненко, Е.В. Ганцгорн, О.М. Куделина, А.В. Мороз Возможности применения гуминовых веществ в сопроводительной терапии онкологических больных	238
И.В. Замлелая, А.В. Сафроненко, Н.В. Сухорукова, А.В. Каплиев, А.В. Криштопа, С.С. Хрхрян Лекарственные поражения печени при применении цефалоспоринов	244
Е.В. Реброва, Е.В. Ших Оценка влияния полиморфного маркера A1166C гена рецептора к ангиотензину II 1-го типа (<i>AGTRI</i>) на динамику показателей суточного мониторингирования артериального давления у пациентов с артериальной гипертензией 1–2-й степени	248

■ METHODS AND TECHNOLOGIES OF BIOMEDICAL RESEARCH

Yulia E. Antipova, Kenes T. Erimbetov, Olga V. Buyuklinskaya

Development of a Clathrate Complex of 3-(2-Phenylethyl)-2-Thioxo-1,3-Thiazolidin-4-One with B-Cyclodextrin and Studying its Antitumor Activity 14

Vyacheslav V. Bykov, Alisa A. Vologzhannikova, Maria V. Trunilina,

Timofey A. Kudryashov, Yulia S. Lapteva, Andrey S. Sokolov

Determination of an Optimal Temperature Range of Methionine Aminopeptidase from *Thermus thermophilus* 20

Elena V. Gantsgorn, Andrey V. Safronenko, Viktoriya I. Polyakova,

Roland M. Manvelyan, Artur A. Baloyan, Ibragim M. Malleev, Denis D. Kalashnikov

Effectiveness and Safety of Modern Hemostatics Based on Chitosan and Kaolin 25

Alexey S. Gladchuk, Pavel N. Varioshkin, Ekaterina G. Batotsyrenova, Yana K. Kalninia,

Ekaterina A. Zolotoverkhaya, Arina V. Andreeva, Ekaterina P. Podolskaya

Application of Langmuir Technology for Profiling Free Fatty Acids by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry 30

Natalya A. Goryacheva

Orthotopic Model of Human Glioblastoma 35

Yulia V. Gurman, Nataliya S. Tropskaya, Elena V. Klychnikova

Metabolic Adaptation During Long-Term Food Deprivation 38

Vadim A. Ezerskiy, Elena M. Koloskova

Dependence of the Antibody Response of Young Sheep on the Method of Immunization with Recombinant Myostatin 42

Anastasiia M. Zubalii, Mariya M. Guseva

Investigation of the Digestion Peculiarities of Siberian Musk Deer Kept under Farm Conditions . 49

Olga B. Zhukova, Elena M. Koloskova

Immunization of Lambs with Recombinant Myostatin Affects Growth Rates 54

Ashot M. Manoyan, Andrey V. Machulin, Tigran T. Papazyan,

Olga E. Ivanova, Alexander N. Panin

Creation of a Synergistic Symbiotic Based on the Consortium of Lactobacilli *Limosilactobacillus fermentum* 3872, *Ligilactobacillus salivarius* 7247, and the Actigen Prebiotic for Salmonellosis Prevention in Humans and Farm Animals. 59

Alexandra S. Melekhova, Jury Ju. Ivnitsky, Konstantin A. Krasnov, Alisa V. Belskaya

Experimental Models for Screening First Aid Medications for Convulsive Syndrome of Obscure Etiology 65

**Elena V. Panina, Vladislav N. Karkischenko, Konstantin S. Ostrenko,
Dmitry V. Petrov, Anastasia E. Sorochan**
Morphofunctional Characteristics of *Chinchilla lanigera* Liver and Kidneys
in the Setting of Hydrogen-Rich Water Regime70

**Igor A. Pomytkin, Melik T. Gasanov, Vladislav N. Karkischenko, Maxim S. Nesterov,
Yuriy V. Fokin, Natalia V. Petrova, Oksana V. Alimkina, Nikolay N. Karkischenko**
Role of Technological Innovations in the Creation of Novel Deer Musk-Based Drugs 77

Veronika A. Prikhodko, Tatyana M. Matuzok, Natalya O. Selizarova, Sergey V. Okovitiy
Comparative Analysis of Effects of Chloral Hydrate and Tribromoethanol
on Electroneuromyographic Parameters in Mice 89

**Marina Y. Ravaeva, Igor V. Cheretaev, Elena N. Chuyan, Mariya V. Nagorskaya,
Pavel A. Galenko-Yaroshevskii, Anait V. Zelenskaya, Irina S. Mironyuk,
Elviza R. Dzeldubaeva**
Modification of Rat Cardiovascular System Parameters in an Ischemia-Reperfusion
Model Using Extremely High Frequency Electromagnetic Radiation 94

**Olga I. Stepanova, Roman A. Klesov, Khyzyr Kh. Semenov, Irina B. Alchinova,
Anton B. Cherepov, Arkady A. Metelkin, Mikhail Yu. Karganov, Alla O. Nikolskaya,
Nina A. Onishchenko, Yulia B. Basok**
Changes in Tissue Oxidative Metabolism Predict the Severity
of Disorders in the System of Blood and Bone Marrow Cells in a Mouse Model
of Type 2 Diabetes Mellitus107

Nataliya S. Tropskaya, Yulia V. Gurman, Kristina V. Zatorkina
Experimental Study of Blood Flow in the Stomach and Small Intestine
Using Ultrasonic Flowmetry 113

**Olga B. Ustinnikova, Irina M. Shcherbachenko, Oksana N. Kolesnikova,
Daria D. Makarishcheva, Julia E. Isakina, Olga B. Rounova**
Issues of Physicochemical Quality Assessment of Immunobiological Medicinal Products
in the Context of Formation of a Regulatory System in the Eurasian Economic Union117

Andrey V. Sharabanov, Ekaterina G. Batotsyrenova, Vadim A. Kashuro, Melik T. Gasanov
Pharmacological Correction of Physical Performance in Male Rats
with Peptide Preparations when Changing the Lighting Regime129

■ RELEVANT AND ALTERNATIVE BIOMODELLING

**Arina V. Bervinova, Viktor A. Palikov, Igor A. Dyachenko, Rustam R. Amirov,
Nikolay B. Pavlov, Aleksey T. Logunov, Arkadiy N. Murahsev**
Biomodeling of Decompression Sickness in Rats135

Viktor A. Palikov, Nikolay B. Pavlov, Rustam R. Amirov, Alina M. Ismailova, Sofia O. Afanasyeva, Evgeniy S. Mikhailov, Arina V. Bervinova, Igor A. Dyachenko, Aleksey T. Logunov, Arkadiy N. Murashev Use of a Hyperoxic Heated Helium-Oxygen Mixture in an Experimental Model of Cerebral Arterial Air Embolism	140
Maxim V. Shinelev Modeling of Hypobaric and Hemic Hypoxia	147
■ NON-CLINICAL RESEARCH IN BIOMEDICINE	
Natalya A. Anisimova, Alexandra O. Ezhova Studying the Hypoglycemic Activity of Combinations of Maloben with Synthetic Antidiabetic Drugs on a Streptozocin Model of Diabetes Mellitus	151
Natalya A. Borozdina, Irina N. Gladkikh Development of Diabetic Neuropathy in C57BL/6 Mice in the Setting of a High-Fat Diet	156
Polina A. Golubinskaya, Arina S. Pikina, Eugene S. Ruchko, Evgeniya V. Kozhenevskaya, Anton Dz. Pospelov, Aleksey A. Babaev, Viktor A. Ivanov, Julia A. Bespyatykh, Lev S. Shnayder, Artem V. Ereemeev Study of the Biodistribution of a Tissue-Engineered Product Based on Human Chondrocytes of Various Sources after Implantation into Balb/c Nude Mice	160
Renata A. Dalevich, Igor A. Dyachenko Model of Monoiodoacetate-Induced Osteoarthritis in Laboratory Animals	176
Ekaterina M. Evgenieva, Alexandra V. Chernomordova, Sergey V. Okovityi, Alexander N. Kulikov Modeling of Heart Failure with Cyclophosphamide	182
Dmitry Yu. Ivkin, Marina V. Krasnova, Evgeniy D. Semivelichenko, Andrew A. Karpov, Vladislav E. Kovanskov, Sergey V. Okovityi Comparative Efficacy of Etmaben and Empagliflozin in Mono- and Combined Therapy of Experimental Chronic Heart Failure	187
Kirill S. Kachalov, Anna S. Solomina, Anastasia V. Rodina Reproductive Disorders in Mothers And Offspring of Rats in Gestational Diabetes Modelled with a High-Calorie Diet in Combination with Tyloxapol	191
Tatyana M. Matuzok, Veronika A. Prikhodko, Vadim E. Karev, Olga V. Buyuklinskaya, Sergey V. Okovityi Pathomorphological Changes in Liver and Skeletal Muscle Tissue in db/db Mice of Different Ages	197
Vladimir M. Pavlov, Anastasia Yu. Fedotova Stress-Protective Properties of the APHC3 Peptide in an Elevated Cross-Shaped Maze Test in ICR Mice	202

Natalya A. Perepechenova, Elena A. Tukhovskaya, Alina M. Ismailova, Elvira R. Shayhutdinova, Gulsara A. Slashcheva, Elena S. Sadovnikova, Igor A. Dyachenko, Arkadiy N. Murashev Taxifolin Antihypertensive Effect in an Age-Related Hypertension Model	206
Evgeniy D. Semivelichenko, Anton S. Romanovsky, Aleksey V. Eremin, Svetlana M. Napalkova, Olga V. Buyuklinskaya Assessment of the Wound-Healing Effect of Hydrogels on an Experimental Burn Model in Rodents	211
Nataliia S. Strelnikova, Olga M. Rozanova, Helena N. Smirnova, Tatiana A. Belyakova, Elena A. Kuznetsova Effect of Xylazine/Zoletil Anesthesia on the Survival of Mice after Exposure to Radiations with Different Values of Linear Energy Transfer	216
Nikita V. Trusov, Anastasia S. Balakina, Kristina V. Mzhelskaya, Nikolay S. Nikitin, Ilya V. Aksenov, Galina V. Guseva, Victor A. Tutelyan Effect of Resveratrol on the Development of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Rats Fed on High-Fat High-Fructose Diet	221
Anastasia Yu. Fedotova, Vladimir M. Pavlov Anxiolytic Properties of the TRPV1 Receptor Antagonist in a Dark/Light Chamber Test on ICR Mice	229
Marina P. Shevelyova, Evgeniya I. Deryusheva, Ekaterina L. Nemashkalova, Alisa A. Vologzhannikova, Aliya A. Nazipova, Ekaterina A. Litus Interaction of β -amyloid Peptide with Insulin Detemir Studied by Biolayer Interferometry and Molecular Modelling	233
■ BIOMEDICAL TECHNOLOGIES IN CLINICAL STUDIES	
Nikita S. Benderskii, Andrey V. Safronenko, Elena V. Gantsgorn, Oksana M. Kudelina, Anna V. Moroz Potential of Humic Substances in the Concomitant Therapy of Cancer Patients	238
Irina V. Zamlelaya, Andrey V. Safronenko, Natalya V. Sukhorukova, Andrey V. Kapliev, Anna V. Krishtopa, Sofia S. Khrkhrian Drug-Induced Liver Damage when Using Cephalosporins	244
Ekaterina V. Rebrova, Evgeniya V. Shikh Assessment of the Effect of A1166C Polymorphic Marker of Angiotensin II Type 1 Receptor Gene (<i>AGTR1</i>) on the Dynamics of Daily Blood Pressure in Patients with Stage 1–2 Arterial Hypertension	248

РАЗРАБОТКА КЛАТРАТНОГО КОМПЛЕКСА 3-(2-ФЕНИЛЭТИЛ)-2-ТИОКСО-1,3-ТИАЗОЛИДИН-4-ОНА С В-ЦИКЛОДЕКСТРИНОМ И ИЗУЧЕНИЕ ЕГО ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ

Ю.Е. Антипова¹, К.Т. Еримбетов^{2,*}, О.В. Буюклинская³

¹ ФГБОУ ВО «Северный государственный медицинский университет» Минздрава России
163069, Российская Федерация, Архангельск, Троицкий просп., 5

² ООО «Научно-исследовательский технологический центр
«Превентивной информационной медицины»
249030, Российская Федерация, Калужская обл., Обнинск, Киевское ш., 3, стр. 2, оф. 8

³ ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Минздрава России
197376, Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 14, лит. А

Цель работы: разработать и исследовать противоопухолевое действие клатратного комплекса производного роданина (ПР) соединения 3-(2-фенилэтил)-2-тиоксо-1,3-тиазолидин-4-она с β -циклодекстрином. По физико-химическим и биофармацевтическим свойствам клатратный комплекс ПР с β -циклодекстрином с соотношением масс 1:5 и средним размером частиц 40,5 нм является фармакологически активным перспективным препаратом. Показано, что разрабатываемый клатратный комплекс ПР с β -циклодекстрином обладает выраженным антипролиферативным и антиметастатическим действием в отношении опухолей эпидермоидной карциномы лёгкого Льюис. ПР в составе клатратного комплекса с β -циклодекстрином обеспечивает эффективное торможение роста опухоли и метастатического процесса, увеличение средней продолжительности жизни животных, снижение количества метастазов в лёгких, подавление жизнеспособности клеток в МТТ-тесте. Результаты исследований позволяют рекомендовать дальнейшие исследования ПР в виде клатратного комплекса с β -циклодекстрином в качестве средства для лечения онкологических заболеваний, вызванных гиперэкспрессией GSK-3 β , и возможностей его применения как самостоятельного средства, так и в комбинированной терапии с другими противоопухолевыми средствами. Обоснованием для практического применения клатратного комплекса ПР с β -циклодекстрином в качестве противоопухолевого средства является его физиологическая безопасность.

Ключевые слова: 3-(2-фенилэтил)-2-тиоксо-1,3-тиазолидин-4-он, клатратный комплекс, противоопухолевая активность, метастазы, торможение роста опухоли, киназа гликогенсинтаза 3 β

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Антипова Ю.Е., Еримбетов К.Т., Буюклинская О.В. Разработка клатратного комплекса 3-(2-фенилэтил)-2-тиоксо-1,3-тиазолидин-4-она с β -циклодекстрином и изучение его противоопухолевой активности. *Биомедицина*. 2024;20(3E):14–19. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-14-19>

Поступила 15.04.2024

Принята после доработки 28.05.2024

Опубликована 01.11.2024

DEVELOPMENT OF A CLATHRATE COMPLEX OF 3-(2-PHENYLETHYL)-2-THIOXO-1,3-THIAZOLIDIN-4-ONE WITH β -CYCLODEXTRIN AND STUDYING ITS ANTITUMOR ACTIVITY

Yulia E. Antipova¹, Kenes T. Erimbetov^{2,*}, Olga V. Buyuklinskaya³

¹ Northern State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia
163069, Russian Federation, Arkhangelsk, Troitskiy Ave., 5

² Research Technological Center "Preventive Information Medicine"
249030, Russian Federation, Kaluga Region, Obninsk, Kievskoe Highway, 3, Building 2, Office 8

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

This work is aimed at developing and studying the antitumor action of a clathrate complex of a rhodanine derivative (RD) of the 3-(2-phenylethyl)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-one compound with β -cyclodextrin. In terms of physicochemical and biopharmaceutical properties, the RD clathrate complex with β -cyclodextrin with a mass ratio of 1:5 and an average particle size of 40.5 nm is a promising pharmacologically active drug. The developed RD clathrate complex with β -cyclodextrin exhibits a pronounced antiproliferative and antimetastatic effect against epidermoid Lewis lung carcinoma tumors. RD as part of a clathrate complex with β -cyclodextrin enables effective inhibition of tumor growth and metastatic processes, increasing the average life expectancy of animals, reducing the number of metastases in the lungs, and suppressing cell viability in an MTT assay. The results obtained confirm the feasibility of further research into the RD clathrate complex with β -cyclodextrin as a means for treating oncological diseases caused by hyperexpression of GSK-3 β both as an independent agent and in a combination therapy with other antitumor agents. Due to its physiological safety, the RD clathrate complex with β -cyclodextrin is a promising antitumor agent for practical application.

Keywords: 3-(2-phenylethyl)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-one, clathrate complex, antitumor activity, metastases, tumor growth inhibition, glycogen synthase kinase 3 β

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

For citation: Antipova Yu.E., Erimbetov K.T., Buyuklinskaya O.V. Development of a Clathrate Complex of 3-(2-Phenylethyl)-2-Thioxo-1,3-Thiazolidin-4-one with β -Cyclodextrin and Studying its Antitumor Activity. *Journal Biomed.* 2024;20(3E):14–19. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-14-19>

Submitted 15.04.2024

Revised 28.05.2024

Published 01.11.2024

За последние два десятилетия многочисленные исследования предоставили доказательства ключевой роли киназы гликогенсинтазы-3 β (GSK-3 β) в прогрессировании более 25 различных типов рака, включая рак поджелудочной железы [11].

GSK-3 β представляет собой консервативную серин/треониновую киназу, которая регулирует ключевые клеточные процессы, включая пролиферацию клеток, репарацию

ДНК, развитие клеточного цикла, сигнальные и метаболические пути. GSK-3 β участвует во множестве биологических процессов и путей в сложных молекулярных сетях клеток, где она взаимодействует почти со 100 или более структурными и функциональными белками посредством фосфорилирования [9]. Ферментативная активность GSK-3 β регулируется дифференциальным фосфорилированием её остатков S9 (неак-

тивная форма) и тирозина (Y)216 (активная форма). Несмотря на то, что GSK-3 β обычно активна в клетках, ингибирующая регуляция её активности в первую очередь полезна нормальным клеткам для поддержания их жизнедеятельности и гомеостаза в ответ на различные внеклеточные и внутриклеточные стимулы [8, 9]. Из-за избыточности клеточной экспрессии и функций между GSK-3 β и её изоформой GSK-3 α патологическая роль GSK-3 β привлекла к себе повышенное внимание. Аберрантная активность и экспрессия GSK-3 β , а также дефекты её ингибирующей регуляции способствуют патогенезу и прогрессированию распространённых заболеваний, включая сахарный диабет 2-го типа, нейродегенеративные заболевания (например, болезнь Альцгеймера), воспалительные и иммунологические заболевания и рак [3, 5]. Учитывая её противодействующие функции в нормальных клетках и заболеваниях, GSK-3 β считается потенциальной терапевтической мишенью при серьёзных нарушениях здоровья, что стимулирует идентификацию и разработку фармакологических ингибиторов GSK-3 β [12].

Биохимия, биология и функции киназ семейства GSK-3 (GSK-3 α и GSK-3 β) в нормальных клетках, а также их участие в широком спектре распространённых заболеваний всё больше привлекают внимание учёных в области биомедицины и фармакологии [5].

GSK-3 β играет роль в формировании и доброкачественных, и злокачественных новообразований. Недавно она была названа одним из ключевых факторов, участвующим в возникновении и прогрессировании рака поджелудочной железы, а также в приобретении химиорезистентности [10]. Накопленные данные позволяют предположить, что степень экспрессии GSK-3 β коррелирует с процессом онкогенеза и прогрессированием опухолеобразования. Однако по поводу влияния

GSK-3 β на процесс роста опухоли ещё ведутся споры — оказывает ли она подавляющее или стимулирующее действие. Кроме того, сверхэкспрессия GSK-3 β влияет на рост опухоли и способствует чувствительности клеток к химиотерапии. Однако основные механизмы влияния GSK-3 β на онкогенез остаются неясными и требуют дальнейшего углублённого изучения [4].

GSK-3 β участвует в биологических процессах онкогенеза, поэтому целесообразно использовать ингибиторы GSK-3 β для воздействия на злокачественные опухоли. Об эффектах ингибиторов GSK-3 β в сочетании с радиацией и химиотерапевтическими препаратами сообщалось при различных типах рака, что позволяет предположить, что GSK-3 β будет играть важную роль в лечении онкологических заболеваний. GSK-3 β является участником нескольких сигнальных путей, включая Wnt/ β -катенин, PI3K/PTEN/AKT и Notch. GSK-3 β также участвует в репарации ДНК посредством фосфорилирования факторов репарации ДНК и влияния на их связывание с хроматином. Основное внимание уделяется молекулярному механизму GSK-3 β в репарации ДНК, особенностям репарации вырезания оснований и репарации двухцепочечных разрывов, роли GSK-3 β в ингибировании апоптоза посредством активации NF- κ B, а также влиянию ингибиторов GSK-3 β на радио- и химиосенсибилизацию различных типов рака [6].

В настоящее время активно обсуждается, что некоторые ингибиторы GSK-3 β оказывают влияние на процесс онкогенеза в тканях и органах при гиперэкспрессии этого фермента. Одним из ингибиторов GSK-3 β , ответственным за фосфорилирование и инактивацию гликогенсинтазы, является производное роданина (ПР) соединение 3-(2-фенилэтил)-2-тиоксо-1,3-тиа-золидин-4-он — его ингибирующая активность, выраженная в виде концентрации

полумаксимального ингибирования (IC₅₀), составляет 35 мкМ [1, 7].

При этом актуальным вопросом является улучшение биофармацевтических свойств данного соединения, а именно его растворимости и биологической доступности, в связи с его неудовлетворительными физико-химическими характеристиками — в частности, оно практически нерастворимо в водной среде. В целом, это может обусловить снижение фармакологического и физиологического действия данного соединения. В связи с этим одним из решений изменения физико-химических свойств является создание на основе ПР решётчатого клатрата с β-циклодекстрином. Образование клатратного комплекса ПР с β-циклодекстрином происходит за счёт атомно-молекулярного связывания в надмолекулярные структуры посредством химических или физических взаимодействий, в результате чего происходит повышение растворимости соединений и их биологической доступности, что позволит уменьшить дозы действующего вещества [2].

Клатратный комплекс ПР с β-циклодекстрином был получен на основе фармакологически активного соединения 3-(2-фенилэтил)-2-тиоксо-1,3-тиазолидин-4-она. Данное ПР имеет следующие характеристики: эмпирическая формула — C₁₁H₁₁NOS₂; молекулярная масса — 237,30; температура плавления — в пределах 110–112°C; внешний вид — порошок жёлтого цвета, без запаха; по тесту растворимости относится к легкорастворимому в хлороформе и ацетоне, малорастворимому в этаноле и метаноле, 2-пропаноле, гексане, практически нерастворимому в воде.

Клатратный комплекс ПР с β-циклодекстрином при массовом соотношении 1:5 был получен в виде порошка белого цвета с жёлтым оттенком и имел средний размер частиц равный 40,5 нм, при этом размер частиц был в пределах от 15 до 90 нм. Равновесная концентрация

при растворении клатратного комплекса ПР с β-циклодекстрином в соотношениях ПР:β-циклодекстрин=1:5 составила около 0,03 мг/мл, их смеси 1:5 (без клатрирования) — 0,014 мг/мл. Полученные данные по исследованиям биологической доступности свидетельствуют о том, что по её уровню клатратный комплекс ПР с β-циклодекстрином превышает 6,08 раза аналогичное значение исходного соединения (ПР).

Таким образом, по физико-химическим и биофармацевтическим свойствам клатратный комплекс ПР с β-циклодекстрином с соотношением масс 1:5 и средним размером частиц 40,5 нм является фармакологически активным, перспективным к исследованию препаратом, который может быть применён в качестве противоопухолевого средства.

Нами было продемонстрировано, что разрабатываемый клатратный комплекс ПР с β-циклодекстрином обладает выраженным антипролиферативным и антиметастатическим действием в отношении опухоли эпидермоидной карциномы лёгкого Льюис. Внутривенное введение в течение 21 дня исследуемого комплекса мышам-опухоленосителям обеспечивает эффективное торможение роста опухоли (45–70%) и метастатического процесса, увеличение средней продолжительности жизни животных (на 38–75%), снижение количества метастазов в лёгких (до 2,7 раза по сравнению с контролем). Жизнеспособность клеток, по данным МТТ-теста, была существенно ниже после инкубации с препаратом в обеих использованных концентрациях (10 и 20 мкМ) по сравнению с животными в группе контроля.

Полученные результаты позволяют рекомендовать дальнейшие исследования клатратного комплекса ПР с β-циклодекстрином в качестве средства для лечения онкологических заболеваний, вызванных гиперэкспрессией GSK-3β, и возможности его применения как самостоятельного

препарата, так и в составе комбинированной терапии с другими противоопухолевыми средствами.

Обоснованием для практического применения клатратного комплекса ПР с β -циклодекстрином в качестве противоопухолевого средства является его физиологическая безопасность, что подтверждается отсутствием мутагенных свойств в тесте

хромосомных нарушений в клетках костного мозга самцов и самок мышей, влияния на внешний вид и поведение животных, повреждающего действия в отношении внутренних органов и систем организма и принадлежности к VI классу относительно безвредных веществ по Hodge и к 5-му классу токсичности в соответствии с ГОСТ 32644-2014.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Еримбетов К.Т., Земляной Р.А., Обвинцева О.В., Пьянкова Е.В., Михайлов В.В. Сигнальные механизмы как факторы физиологической регуляции: роданины и мишени киназы гликогенсинтазы β . *Проблемы биологии продуктивных животных*. 2021;1:41–54. [Erimbetov K.T., Zemlyanoy R.A., Obvintseva O.V., Pyankova E.V., Mikhailov V.V. Signal'nye mekhanizmy kak faktory fiziologicheskoy regul'yatsii: rodaniny i misheni kinazy glikogensintazy β] [Signaling mechanisms as factors of physiological regulation: Rhodanines and targets of glycogen synthase kinase β]. *Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh* [Problems of Productive Animal Biology]. 2021;1:41–54. (In Russian)]. DOI: 10.25687/1996-6733.prodanimbiol.2021.1.41-54
2. Земляной Р.А., Еримбетов К.Т., Федорова А.В., Гончарова А.Я., Бондаренко Е.В. Разработка активного клатрата 3-(2-фенилэтил)-2-тиоксо-1,3-тиазолидин-4-она с β -циклодекстрином и изучение его биодоступности. *Международный вестник ветеринарии*. 2020;3:58–64. [Zemlyanoy R.A., Erimbetov K.T., Fedorova A.V., Goncharova A.Ya., Bondarenko E.V. Razrabotka aktivnogo klatrata 3-(2-feniletil)-2-tiokso-1,3-thiazolidin-4-ona s β -tsiklodekstrinom i izuchenie ego biodostupnosti] [Development of an active clathrate of 3-(2-phenylethyl)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-one with β -cyclodextrin and study of its bioavailability]. *Mezhdunarodnyy vestnik veterinarii* [International Bulletin of Veterinary Medicine]. 2020;3:58–64. (In Russian)]. DOI: 10.17238/issn2072-2419.2020.3.58
3. Beurel E., Grieco S.F., Jope R.S. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): Regulation, actions, and diseases. *Pharmacol. Ther.* 2015;148:114–131. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2014.11.016
4. He R., Du S., Lei T., Xie X., Wang Y. Glycogen synthase kinase β in tumorigenesis and oncoterapy (Review). *Oncol. Rep.* 2020;44(6):2373–2385. DOI: 10.3892/or.2020.7817
5. Hoffmeister L., Diekmann M., Brand K., Huber R. GSK3: A kinase balancing promotion and resolution of inflammation. *Cells*. 2020;9(4):820. DOI: 10.3390/cells9040820
6. Lin J., Song T., Li C., Mao W. GSK- β in DNA repair, apoptosis, and resistance of chemotherapy, radiotherapy of cancer. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 2020;1867(5):118659. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2020.118659
7. Martinez A., Alonso M., Castro A., Dorronsoro I., Gelpi J.L., Luque F.J., Pérez C., Moreno F.J. SAR and 3D-QSAR Studies on thiadiazolidinone derivatives: Exploration of structural requirements for glycogen synthase kinase 3 inhibitors. *J. Med. Chem.* 2005;48(23):7103–7112. DOI: 10.1021/jm040895g
8. McCubrey J.A., Cocco L. GSK-3 signaling in health. *Adv. Biol. Regul.* 2017;65:1–4. DOI: 10.1016/j.jbior.2017.06.004
9. Patel P., Woodgett J.R. Glycogen synthase kinase 3: A kinase for all pathways? *Curr. Top. Dev. Biol.* 2017;123:277–302. DOI: 10.1016/bs.ctdb.2016.11.011
10. Pecoraro C., Faggion B., Balboni B., Carbone D., Peters G.J., Diana P., Assaraf Y.G., Giovannetti E. GSK3 β as a novel promising target to overcome chemoresistance in pancreatic cancer. *Drug Resist. Updat.* 2021;58:100779. DOI: 10.1016/j.drug.2021.100779
11. Uehara M., Domoto T., Takenaka S., Takeuchi O., Shimasaki T., Miyashita T., Minamoto T. Glycogen synthase kinase β : The nexus of chemoresistance, invasive capacity, and cancer stemness in pancreatic cancer. *Cancer Drug Resist.* 2024;7:4. DOI: 10.20517/cdr.2023.84
12. Wei J., Wang J., Zhang J., Yang J., Wang G., Wang Y. Development of inhibitors targeting glycogen synthase kinase- β for human diseases: Strategies to improve selectivity. *Eur. J. Med. Chem.* 2022;236:114301. DOI: 10.1016/j.ejmech.2022.114301

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Антипова Юлия Евгеньевна, ФГБОУ ВО «Северный государственный медицинский университет» Минздрава России;
e-mail: jul.antipova@icloud.com

Yulia E. Antipova, Northern State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: jul.antipova@icloud.com

Еримбетов Кенес Тагаевич*, д.б.н., ООО «Научно-исследовательский технологический центр «Превентивной информационной медицины»;
e-mail: erimbetovkt@mail.ru

Kenes T. Erimbetov*, Dr. Sci. (Biol.), Research Technological Center “Preventive Information Medicine”;
e-mail: erimbetovkt@mail.ru

Буюклинская Ольга Владимировна, д.м.н., доц., ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России;
e-mail: olga.buyklinskaya@pharminnotech.com

Olga V. Buyuklinskaya, Dr. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: olga.buyklinskaya@pharminnotech.com

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПТИМАЛЬНОГО ДИАПАЗОНА ТЕМПЕРАТУР ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ МЕТИОНИН АМИНОПЕПТИДАЗЫ ИЗ *THERMUS THERMOPHILUS*

В.В. Быков, А.А. Вологжанникова, М.В. Трунилина, Т.А. Кудряшов,
Ю.С. Лаптева*, А.С. Соколов

Институт биологического приборостроения ФГБУН «Федеральный исследовательский центр
«Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»
142290, Российская Федерация, Московская обл., Пушкино, просп. Науки, 3

Отщепление N-концевого иницирующего метионина (Met1) затрагивает 50–70% клеточных белков и является важной посттрансляционной модификацией, которую катализируют специфические ферменты — метионин аминопептидазы (МАП). Рекомбинантные МАП из *E. coli* и человека применяют в научных исследованиях, а также в биотехнологии для удаления Met1 из рекомбинантных белков при их гетерологичной сверхэкспрессии в *E. coli*. Различия в субстратной специфичности и условиях функционирования известных МАП обуславливают поиск новых ферментов, способных работать при повышенных температурах. Нами клонирована МАП из гипертермофильной бактерии, разработана методика очистки фермента, исследована активность фермента в широком диапазоне температур. Нами показано, что МАП из *Thermus thermophilus* наиболее активна при температуре от 75 до 95°C. Новый фермент может быть использован для удаления N-концевого метионина из рекомбинантных белков *in vitro* в условиях повышенных температур.

Ключевые слова: метионин аминопептидаза, *Thermus thermophilus*, гетерологичная экспрессия, удаление N-концевого метионина

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 23-24-00563.

Для цитирования: Быков В.В., Вологжанникова А.А., Трунилина М.В., Кудряшов Т.А., Лаптева Ю.С., Соколов А.С. Определение оптимального диапазона температур функционирования метионин аминопептидазы из *Thermus thermophilus*. *Биомедицина*. 2024;20(3E):20–24. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-20-24>

Поступила 15.04.2024

Принята после доработки 18.06.2024

Опубликована 01.11.2024

DETERMINATION OF AN OPTIMAL TEMPERATURE RANGE OF METHIONINE AMINOPEPTIDASE FROM *THERMUS THERMOPHILUS*

Vyacheslav V. Bykov, Alisa A. Vologzhannikova, Maria V. Trunilina,
Timofey A. Kudryashov, Yulia S. Lapteva*, Andrey S. Sokolov

Institute of Biological Instrumentation, Pushchino Scientific Center for Biological Research
of the Russian Academy of Sciences
142290, Russian Federation, Moscow Region, Pushchino, Nauki Ave., 3

Removal of the N-terminal initiator methionine (Met1) affects 50–70% of cellular proteins, being an important post-translational modification. This modification is catalyzed by such specific enzymes as methionine aminopeptidases (MAP). Recombinant MAPs from *E. coli* and humans are used in scientific research, as well as in biotechnology to remove Met1 from recombinant proteins under their heterologous overexpression in *E. coli*. Differences in substrate specificity and operating conditions of known MAPs warrants the search for new enzymes capable of operating at elevated temperatures. We cloned an MAP from a hyperthermophilic bacterium, developed a method for purifying the enzyme, and studied the activity of the enzyme in a wide temperature range. We show that the MAP from *Thermus thermophilus* is most active at temperatures from 75 to 95°C. The new enzyme can be used to remove N-terminal methionine from recombinant proteins *in vitro* at elevated temperatures.

Keywords: methionine aminopeptidase, *Thermus thermophilus*, heterologous expression, N-terminal methionine excision

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

Funding: research was funded by the Russian Science Foundation, grant No. 23-24-00563.

For citation: Bykov V.V., Vologzhannikova A.A., Trunilina M.V., Kudryashov T.A., Lapteva Yu.S., Sokolov A.S. Determination of an Optimal Temperature Range of Methionine Aminopeptidase from *Thermus thermophilus*. *Journal Biomed.* 2024;20(3E):20–24. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-20-24>

Submitted 15.04.2024

Revised 18.06.2024

Published 01.11.2024

Введение

Метионин аминокептидазы (МАП) — ферменты, которые специфически удаляют инициаторный N-концевой метионин (Met1) из растущей полипептидной цепи в процессе биосинтеза белка в клетках [5]. МАП эукариот участвуют в ангиогенезе и рассматриваются в качестве мишеней для лечения онкологических заболеваний [8]. Механизмы ингибирования МАП патогенных бактерий рассматривают в качестве альтернативы антибиотикам [6]. Рекombинантные МАП из *E. coli* и человека применяют в научных исследованиях, а также в биотехнологии для удаления Met1 из рекombинантных белков при их гетерологичной сверхэкспрессии в *E. coli*, поскольку удаление Met1 из белка часто имеет решающее значение в поддержании его стабильности и функции [1, 2, 4, 7]. Имеющиеся в настоящее время коммерчески доступные МАП *E. coli* и человека обладают ограниченной специфичностью и условиями проведения реакций. В этой связи актуальна идентификация МАП, спо-

собных работать в условиях повышенных температур и широкого диапазона pH.

Ранее нами была клонирована новая МАП из *Thermus thermophilus* и при помощи биофизических методов установлено, что фермент стабилен в широком диапазоне pH и устойчив к повышению температур с серединой полуперехода металл-связанной формы при 92°C [1]. Однако специфическая функциональная активность фермента при разных температурах не была нами исследована.

Целью данной работы является изучение температурного оптимума функционирования метионин аминокептидазы из гипертермофильной бактерии *Thermus thermophilus*.

Материалы и методы

Метионин аминокептидаза (GenBank: TTH_RS08450) *Thermus thermophilus* HB8 (BKM B-1605) получена, как описано ранее [1]. Функциональную активность МАП измеряли с помощью специфиче-

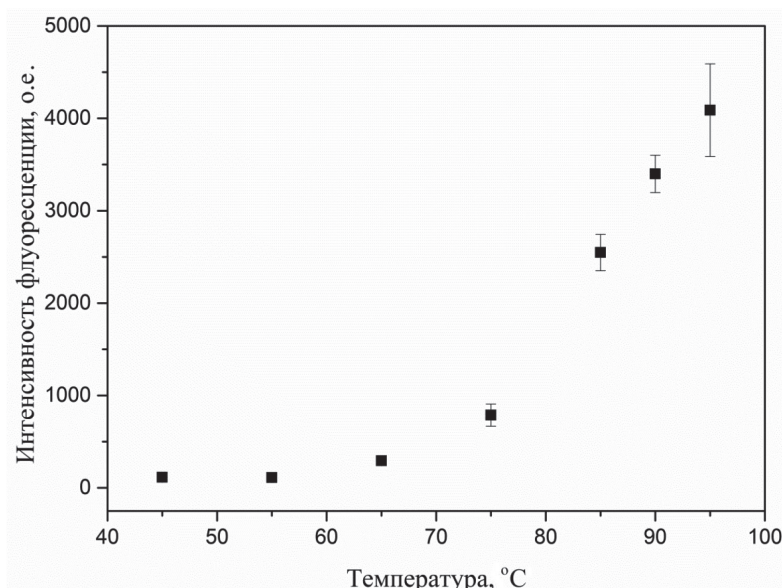


Рис. Активность МАП в отношении Met-AMC при различных температурах.
Fig. MAP activity toward Met-AMC at different temperatures.

ского флуорогенного субстрата для пептидаз L-метионин 7-амино-4-метилкумарин (Met-AMC). При отщеплении метионина 7-амино-4-метилкумарин флуоресцирует (длина волны возбуждения — 380 нм, эмиссии — 460 нм). Для анализа активности МАП 100 мкл реакционной смеси, содержащей 50 мМ боратный буфер, pH=8,3, 150 мМ KCl, 100 мкМ CoCl₂, 1 мкМ МАП и 200 мкМ Met-AMC, выдерживали в течение 30 мин в диапазоне температур от 45–95°C с шагом в 10 градусов. Реакцию останавливали добавлением хелатора ЭДТА. Отслеживание эмиссии флуоресценции высвободившихся свободных AMC осуществляли с использованием ридера для планшетов BioTek Synergy H1 и черных 384-луночных планшетов Greiner Bio-One #781906. Измерения проводили при температуре 25°C в течение 10 мин, с орбитальным встряхиванием перед каждым измерением. Для каждой температуры измерения проводились в трёх повторях

и был поставлен контроль — реакционная смесь без МАП, который вычитался из опытных реакций при обработке результатов. Обработку результатов и построение графиков проводили при помощи программы OriginPro 8.0.

Результаты и их обсуждение

L-метионин 7-амино-4-метилкумарин (Met-AMC) (наряду с L-метионин паранитроанилидом, Met-pNA) является самым популярным субстратом для исследования функциональной активности МАП в различных условиях (температура, pH, катионы металлов и др.). Результаты проверки активности МАП при различных температурах представлены на рисунке в виде зависимости уровня флуоресценции 7-амино-4-метилкумарина от температуры. Как видно из рисунка, уровень флуоресценции при температурах от 45–65°C значительно ниже, чем при 75–85°C, и достигает максимума к 90–95°C. Результаты свидетельствуют

о том, что максимальную активность фермент проявляет при температуре 90–95°C.

Выводы

Проведённые нами исследования свидетельствуют о том, что новый фермент МАП

из гипертермофильной бактерии *Thermus thermophilus* может применяться в биотехнологии для удаления N-концевого иницирующего метионина из рекомбинантных белков *in vitro* в диапазоне температур 75–95°C.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Лаптева Ю.С., Быков В.В., Трунилина М.В., Болдаевский И.С., Кудряшов Т.А., Вологжанникова А.А., Соколов А.С. Получение сверхстабильной метионинаминокептидазы для удаления метионина из рекомбинантных белков. *Биомедицина*. 2023;19(3E):47–51. [Lapteva Yu.S., Bykov V.V., Trunilina M.V., Boldaevsky I.S., Kudryashov T.A., Vologzhannikova A.A., Sokolov A.S. Poluchenie sverkhstabil'noy metionin-aminopeptidazy dlya udale-niya metionina iz re-kombinantnykh belkov [Obtaining overstable methionine aminopeptidase for the removal of methionine from recombinant proteins]. *Biomeditsina* [Journal Biomed]. 2023;19(3E):47–51. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2713-0428-19-3E-47-51
2. Adachi K., Yamaguchi T., Yang Y., Konitzer P.T., Pang J., Reddy K.S., Ivanova M., Ferrone F., Surrey S. Expression of functional soluble human alpha-globin chains of hemoglobin in bacteria. *Protein Exp. Purif.* 2000;20(1):37–44. DOI: 10.1006/prep.2000.1277
3. Boix E., Wu Y., Vasandani V.M., Saxena S.K., Ardelit W., Ladner J., Youle R.J. Role of the N terminus in RNase A homologues: Differences in catalytic activity, ribonuclease inhibitor interaction and cytotoxicity. *J. Mol. Biol.* 1996;257(5):992–1007. DOI: 10.1006/jmbi.1996.0218
4. Endo S., Yamamoto Y., Sugawara T., Nishimura O., Fujino M. The additional methionine residue at the N-terminus of bacterially expressed human interleukin-2 affects the interaction between the N- and C-termini. *Biochemistry*. 2001;40(4):914–919. DOI: 10.1021/bi001170r
5. Giglione C., Boularot A., Meinel T. Protein N-terminal methionine excision. *Cell Mol. Life Sci.* 2004;61(12):1455–1474. DOI: 10.1007/s00018-004-3466-8
6. Helgren T.R., Chen C., Wangtrakuldee P., Edwards T.E., Staker B.L., Abendroth J., Sankaran B., Housley N.A., Myler P.J., Audia J.P., Horn J.R., Hagen T.J. Rickettsia prowazekii methionine aminopeptidase as a promising target for the development of antibacterial agents. *Bioorg. Med. Chem.* 2017;25(3):813–824. DOI: 10.1016/j.bmc.2016.11.013
7. Liao Y.D., Wang S.C., Leu Y.J., Wang C.F., Chang S.T., Hong Y.T., Pan Y.R., Chen C. The structural integrity exerted by N-terminal pyroglutamate is crucial for the cytotoxicity of frog ribonuclease from *Rana pipiens*. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(18):5247–5255. DOI: 10.1093/nar/gkg746
8. Selvakumar P., Lakshmikuttyamma A., Dimmock J.R., Sharma R.K. Methionine aminopeptidase 2 and cancer. *Biochim. Biophys. Acta.* 2006;1765(2):148–154. DOI: 10.1016/j.bbcan.2005.11.001

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Быков Вячеслав Владимирович, Институт биологического приборостроения ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»;
e-mail: naggilan88@gmail.com

Вологжанникова Алиса Андреевна, к.б.н., Институт биологического приборостроения ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»;
e-mail: lisiks.av@gmail.com

Vyacheslav V. Bykov, Institute of Biological Instrumentation, Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: naggilan88@gmail.com

Alisa A. Vologzhannikova, Cand. Sci. (Biol.), Institute of Biological Instrumentation, Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: lisiks.av@gmail.com

Трунилина Мария Викторовна, Институт биологического приборостроения ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»;

e-mail: masha.trunilina@mail.ru

Maria V. Trunilina, Institute of Biological Instrumentation, Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences;

e-mail: masha.trunilina@mail.ru

Кудряшов Тимофей Андреевич, Институт биологического приборостроения ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»;

e-mail: kudryashovtimm@gmail.com

Timofey A. Kudryashov, Institute of Biological Instrumentation, Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences;

e-mail: kudryashovtimm@gmail.com

Лаптева Юлия Сергеевна*, к.б.н., Институт биологического приборостроения ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»;

e-mail: yulia.s.lapteva@gmail.com

Yulia S. Lapteva*, Cand. Sci. (Biol.), Institute of Biological Instrumentation, Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences;

e-mail: yulia.s.lapteva@gmail.com

Соколов Андрей Сергеевич, к.б.н., Институт биологического приборостроения ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»;

e-mail: 212sok@gmail.com

Andrey S. Sokolov, Cand. Sci. (Biol.), Institute of Biological Instrumentation, Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences;

e-mail: 212sok@gmail.com

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

ЭФФЕКТИВНОСТЬ И БЕЗОПАСНОСТЬ СОВРЕМЕННЫХ ГЕМОСТАТИКОВ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА И КАОЛИНА

Е.В. Ганцгорн*, А.В. Сафроненко, В.И. Полякова, Р.М. Манвелян, А.А. Балоян,
И.М. Маллеев, Д.Д. Калашников

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

Существует множество местных гемостатических средств, однако их недостатки, к которым относят короткий срок хранения, высокую стоимость, отсутствие антисептических свойств, единый механизм действия, остаточную токсичность и др., требуют разработки новых материалов, способных соответствовать как можно большему числу требований к «идеальному» гемостатику. Тем временем, независимо от механизма полученной травмы, осуществление гемостаза имеет ведущее значение для устранения последствий острого кровотечения до момента оказания необходимой медицинской помощи в больнице. В данной статье рассматриваются вопросы безопасности и эффективности одних из наиболее перспективных местных гемостатиков, в частности, созданных из хитозана и каолина.

Ключевые слова: гемостатическое средство, хитозан, каолин, безопасность фармакотерапии, эффективность фармакотерапии

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Ганцгорн Е.В., Сафроненко А.В., Полякова В.И., Манвелян Р.М., Балоян А.А., Маллеев И.М., Калашников Д.Д. Эффективность и безопасность современных гемостатиков на основе хитозана и каолина. *Биомедицина*. 2024;20(3E):25–29. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-25-29>

Поступила 15.04.2024

Принята после доработки 18.07.2024

Опубликована 01.11.2024

EFFECTIVENESS AND SAFETY OF MODERN HEMOSTATICS BASED ON CHITOSAN AND KAOLIN

Elena V. Gantsgorn*, Andrey V. Safronenko, Viktoriya I. Polyakova, Roland M. Manvelyan,
Artur A. Baloyan, Ibragim M. Malleev, Denis D. Kalashnikov

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

There exist numerous local hemostatic agents; however, their disadvantages, such as a short shelf life, high cost, lack of antiseptic properties, a single mechanism of action, residual toxicity, etc., require the development of new materials capable of meeting as many requirements for an “ideal” hemostatic as possible. Meanwhile, regardless of the mechanism of injury, the implementation of hemostasis is of crucial importance for eliminating the consequences of acute bleeding until the provision of the necessary medical care. This article discusses the safety and effectiveness of some of the most promising local hemostatics, in particular, those created from chitosan and kaolin.

Keywords: hemostatic agent, chitosan, kaolin, pharmacotherapy safety, pharmacotherapy performance

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

For citation: Gantsgorn E.V., Safronenko A.V., Polyakova V.I., Manvelyan R.M., Baloyan A.A., Mal-leev I.M., Kalashnikov D.D. Effectiveness and Safety of Modern Hemostatics Based on Chitosan and Kaolin. *Journal Biomed.* 2024;20(3E):25–29. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-25-29>

Submitted 15.04.2024

Revised 18.07.2024

Published 01.11.2024

Введение

Острая кровопотеря, следствием которой является геморрагический шок, остаётся одной из ведущих причин смертности как в боевых условиях, так и в условиях мирного времени в дорожно-транспортных происшествиях, при хирургических вмешательствах. Одним из способов борьбы с ней является применение гемостатических средств (ГС) местного действия. Однако до сих пор не существует ГС, которое бы отвечало всем критериям «идеального»: остановка кровотечения в течение двух минут или менее; действие в широком диапазоне температур; отсутствие повреждающего действия на окружающие ткани и болевых ощущений от сдавливания или термического повреждения; лёгкое нанесение в экстремальных условиях, а также деградация или простое удаление из раны; длительный срок хранения; бактерицидное действие; возможность применения при нарушениях функции свёртывания крови и экономическая доступность.

В настоящее время большой интерес представляют препараты с хитозановой и каолиновой составляющей. Хитозан — органическое вещество, содержащее большое число свободных аминогрупп, позволяющих связываться с ионами водорода и приобретать избыточный положительный заряд, а каолин — инертный природный гидратированный алюмосиликатный минерал, получаемый из глины. Механизм действия первого состоит в том, что при контакте с кровью отрицательно заряженные эритроциты притягиваются к хитозану, что приво-

дит к образованию сгустка в месте дефекта сосудистой стенки и остановке кровотечения. Выделяют разные формы выпуска хитозана: в виде порошка в упаковке, порошка в шприце-аппликаторе, гранул, криогеля и т. д. А действие ГС на основе каолина заключается в активации фактора свёртывания XII, который запускает каскад гемостаза по внутреннему пути. К тому же, открытая каркасно-полостная структура имеет отрицательный заряд, благодаря которому задерживается большое количество катионов, например кальция — кофактора в коагуляционном каскаде [2].

Добывают хитозан и каолин во многих странах, в числе которых США, Великобритания, Россия, Канада, Германия, Франция, Китай, Япония, Италия и др. Особенно преуспели в производстве данных ГС на основе хитозана США, Великобритания, Китай, обеспечивающие экспорт своей продукции по всему миру. Известно, что хитозановые и каолиновые гемостатики приняты к применению в специальных военных подразделениях США, Великобритании, а также вооружёнными силами восьми других стран, входящих НАТО. Командование армии США настаивает на дальнейшем совершенствовании данных ГС для контроля кровотечения, чтобы снизить смертность от острых кровопотерь до 3% в оперативных подразделениях, где смертность от геморрагического шока составляет примерно 24% [2].

Гемостатическая способность хитозана не зависит от пути свёртывания крови в организме, и это дополнительное преимуще-

щество данного вещества по сравнению с боевой марлей. Эффективность хитозановых повязок при коагулопатических состояниях была проверена в шести различных исследованиях на животных. Что касается безопасности, то результаты гистологического исследования открытых тканей показали организованное образование сгустков вблизи повреждённых тканей, в то время как внутри повреждённых кровеносных сосудов они отсутствовали [2]. К тому же, имеются данные многих исследований о том, что хитозановые марли являются ценным гемостатическим средством при длительной эвакуации (с 12 до 72 часов). По данным доклинических и клинических исследований, хитозан и каолин могут сократить время свёртывания крови *in vitro* на 40% [3]. Важным преимуществом хитозанового ГС является его антибактериальный эффект, механизм которого основан на оксидазной активности, сопровождающейся выходом перекиси водорода с её последующей катализацией и образованием гидроксильных радикалов, разрушающих мембраны бактерий. Хитозан также может обеспечить структуру каркаса для целенаправленного роста клеток в области раны. Кроме того, функциональные группы хитозана (аминогруппы и гидроксильные группы) могут взаимодействовать с рецепторами на поверхности клеток, способствовать увеличению адгезии клеток и тканей, проявляя хорошую биосовместимость. Однако, несмотря на упомянутые выше преимущества, у применения каолина имеется отрицательные стороны в виде появления ожогов в месте приложения цеолитов. Возникают они вследствие гидратации ГС и выделения излишнего количества тепла. Чтобы предотвратить данный нежелательный эффект, начали проводить частичную гидратацию каолина и закладывать его в нетканый бинт.

С 2003 г. гемостатические повязки на основе хитозана и каолина с обнадёживающими результатами используются для лечения

травм в условиях военного и гражданского реагирования на чрезвычайные ситуации. В 27 из 34 случаев оказания неотложной медицинской помощи повязка из хитозана и каолина уменьшила кровотечение в течение 3 мин после введения. 21% (7 из 34 случаев) случаев неудачного гемостаза произошёл из-за ошибки оказывающего помощь, которой можно было избежать благодаря лучшему обучению и дизайну продукта [4].

Совсем недавно исследователи объединили преимущества хитозана и каолина с другими материалами для улучшения их гемостатических свойств. Например, авторы работы [1] получили полиэлектролитные комплексы, состоящие из олигосахарида хитозана (COS) и карбоксиметилкрахмала в качестве рассасывающихся гемостатических агентов. Они наблюдали, что полиэлектролитные комплексы, содержащие 10% COS, улучшали гемостаз на модели кровотечения из печени крысы, но эффективность гемостаза снижалась по мере увеличения содержания COS. В недавнем исследовании [2] разработали и оценили гемостатические повязки на основе хитозана/каолина и использовали поверхностно-активное вещество для улучшения равномерного распределения каолина по хитозановым волокнам. Авторы продемонстрировали, что их повязки на основе хитозана/каолина улучшают гемостаз и выживаемость по сравнению с QuikClot® (кровоостанавливающий z-сложенный бинт на основе минеральных веществ) как на моделях кровотечения у крыс, так и у кроликов. Авторы работы [5] приготовили микросферы с сердцевинкой, состоящей из пористого хитозана, и компактной оболочкой, состоящей из альгината, и продемонстрировали, что эта комбинированная микросфера способствует образованию тромбов и более эффективна в качестве гемостатика по сравнению с пористыми микросферами из хитозана по отдельности как на модели ампутации хвоста крысы, так и на модели кровотечения из печени крысы.

Разработанные композиты испытывались при имитации различных кровотечений, при этом отсутствовали такие клинические и биохимические изменения, как гепатоцеллюлярная токсичность, воспаление, активация тромбоцитов, потеря веса или лихорадка, что является подтверждением биосовместимости ГС из хитозана и каолина.

Заключение

Современные исследования позволяют подчеркнуть необходимость использования повязок на основе хитозана и каолина

в качестве потенциальной альтернативы при оказании первой помощи наряду с другими лекарственными средствами, такими как обезболивающие, противоожоговые, антиангинальные и т. д. Очевидно, это обусловлено множеством преимуществ данных гемостатических средств, в т. ч. высокой безопасностью и эффективностью. Созданные модификации на основе уже имеющихся гемостатических материалов с большой перспективой внедряются в практическую деятельность и подвергаются дальнейшему усовершенствованию.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Chen X., Yan Y., Li H., Wang X., Tang S., Li Q., Wei J., Su J. Evaluation of absorbable hemostatic agents of polyelectrolyte complexes using carboxymethyl starch and chitosan oligosaccharide both *in vitro* and *in vivo*. *Biomater. Sci.* 2018;6(12):3332–3344. DOI: 10.1039/c8bm00628h
2. Elsabahy M., Hamad M.A. Design and preclinical evaluation of chitosan/kaolin nanocomposites with enhanced hemostatic efficiency. *Mar. Drugs*. 2021;19(2):50. DOI: 10.3390/md19020050
3. Khan M.A., Mujahid M. A review on recent advances in chitosan based composite for hemostatic dressings. *Int. J. Biol. Macromol.* 2019;124:138–147. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.11.045
4. Mecwan M., Li J., Falcone N., Ermis M., Torres E., Morales R., Hassani A., Haghniaz R., Mandal K., Sharma S., Maity S., Zehtabi F., Zamanian B., Herculano R., Akbari M., V John J, Khademhosseini A. Recent advances in biopolymer-based hemostatic materials. *Regen. Biomater.* 2022;9:rbac063. DOI: 10.1093/rb/rbac063
5. Wu X., Tang Z., Liao X., Wang Z., Liu H. Fabrication of chitosan@calcium alginate microspheres with porous core and compact shell, and application as a quick traumatic hemostat. *Carbohydr. Polym.* 2020;1;247:116669. DOI: 10.1016/j.carbpol.2020.116669

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

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

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

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

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

Полякова Виктория Игоревна, ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России;
e-mail: polyakova.vi@yandex.ru

Viktoriya I. Polyakova, Rostov State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: polyakova.vi@yandex.ru

Манвелян Роланд Меджлумович, ФГБОУ ВО
«Ростовский государственный медицинский
университет» Минздрава России;
e-mail: manvelyan.roland@mail.ru

Roland M. Manvelyan, Rostov State Medical
University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: manvelyan.roland@mail.ru

Балоян Артур Артемович, ФГБОУ ВО
«Ростовский государственный медицинский
университет» Минздрава России;
e-mail: baloyan_2020@list.ru

Artur A. Baloyan, Rostov State Medical University
of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: baloyan_2020@list.ru

Маллеев Ибрагим Махачович, ФГБОУ ВО
«Ростовский государственный медицинский
университет» Минздрава России;
e-mail: ibragimall@icloud.com

Ibragim M. Malleev, Rostov State Medical
University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: ibragimall@icloud.com

Калашников Денис Дмитриевич, ФГБОУ ВО
«Ростовский государственный медицинский
университет» Минздрава России;
e-mail: deniskalashnikov03@gmail.com

Denis D. Kalashnikov, Rostov State Medical
University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: deniskalashnikov03@gmail.com

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

О ПРИМЕНЕНИИ ТЕХНОЛОГИИ ЛЕНГМЮРА ДЛЯ ПРОФИЛИРОВАНИЯ СВОБОДНЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ МЕТОДОМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ С МАТРИЧНО- АКТИВИРОВАННОЙ ЛАЗЕРНОЙ ДЕСОРБЦИЕЙ/ИОНИЗАЦИЕЙ

А.С. Гладчук^{1,2}, П.Н. Вариошкин^{1,*}, Е.Г. Батоцыренова^{1,3}, Я.К. Калниня^{1,2},
Е.А. Золотоверхая¹, А.В. Андреева¹, Е.П. Подольская²

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

² ФГБУН Институт аналитического приборостроения РАН
198095, Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, 31-33, лит. А

³ ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский
университет» Минздрава России
194100, Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул. Литовская, 2

Применение технологии Ленгмюра для анализа свободных жирных кислот позволяет получать монослои, состоящие из монокарбоксилатов бария, а характерное изотопное распределение бария позволяет упростить идентификацию соединений, содержащих данный элемент, в масс-спектрах. Формирование мономолекулярных плёнок Ленгмюра непосредственно на поверхности матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией мишени позволяет сократить и упростить пробоподготовку, а также повысить чувствительность методики профилирования свободных жирных кислот в биологических образцах различной природы.

Ключевые слова: свободные жирные кислоты, МАЛДИ-МС, плазма крови, технология Ленгмюра, монокарбоксилаты бария

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: работа проведена в рамках государственного задания ФМБА России № 388-00071-24-00 (код: 64.002.24.800).

Для цитирования: Гладчук А.С., Вариошкин П.Н., Батоцыренова Е.Г., Калниня Я.К., Золотоверхая Е.А., Андреева А.В., Подольская Е.П. О применении технологии Ленгмюра для профилирования свободных жирных кислот методом масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией. *Биомедицина*. 2024;20(3E):30–34. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-30-34>

Поступила 10.04.2024

Принята после доработки 13.05.2024

Опубликована 01.11.2024

APPLICATION OF LANGMUIR TECHNOLOGY FOR PROFILING FREE FATTY ACIDS BY MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION/IONIZATION MASS SPECTROMETRY

Alexey S. Gladchuk^{1,2}, Pavel N. Varioshkin^{1,*}, Ekaterina G. Batotsyrenova¹,
Yana K. Kalninia^{1,2}, Ekaterina A. Zolotoverkhaya¹,
Arina V. Andreeva¹, Ekaterina P. Podolskaya²

¹ Golikov Research Center of Toxicology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia
192019, Russian Federation, Saint Petersburg, Bekhtereva Str., 1

² Institute for Analytical Instrumentation of the Russian Academy of Sciences
198095, Russian Federation, Saint Petersburg, Ivana Chernykh Str., 31-33A

³ Saint Petersburg State Pediatric Medical University of the Ministry of Health Care of Russia
194100, Russian Federation, Saint Petersburg, Litovskaya Str., 2

The application of Langmuir technology for analyzing free fatty acids makes it possible to obtain monolayers consisting of barium monocarboxylates, while the characteristic isotopic distribution of barium makes it possible to simplify the identification of compounds containing this element in mass spectra. The formation of monomolecular Langmuir films directly on the surface of the matrix-assisted laser desorption/ionization of the target, reduces and simplifies sample preparation, at the same time as increasing the sensitivity of the technique for profiling of free fatty acids in biological samples of different origin.

Keywords: free fatty acids, MALDI-MS, blood plasma, Langmuir technology, barium monocarboxylates

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

Funding: this work performed in the framework of State task of the Federal Medical and Biological Agency of Russia No. 388-00071-24-00 (code: 64.002.24.800).

For citation: Gladchuk A.S., Varioshkin P.N., Batotsyrenova E.G., Kalninia Ya.K., Zolotoverkhaya E.A., Andreeva A.V., Podolskaya E.P. Application of Langmuir Technology for Profiling Free Fatty Acids by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *Journal Biomed.* 2024;20(3E):30–34. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-30-34>

Submitted 10.04.2024

Revised 13.05.2024

Published 01.11.2024

Введение

Масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (МАЛДИ-МС) является хорошо зарекомендовавшим себя методом для чувствительного, высокопроизводительного и экономически эффективного определения широкого ряда аналитов, к которым, в частности, относятся липиды [2]. Тем не менее, анализ свободных жирных кислот (СЖК) методом МАЛДИ-МС зачастую затруднён при использовании распространённых органических матриц, что определяет актуальность разработки новых методик для эффективного определения СЖК с помощью этого метода.

В последние годы всё чаще предлагается формат МАЛДИ-МС-анализа на основе проведения одного или нескольких этапов пробоподготовки непосредственно на поверхности МАЛДИ-мишени, который получил название «лаборатория на ми-

шени», что позволяет сократить время эксперимента, снизить затраты на реактивы и уменьшить количество требуемого образца. Недавно был предложен подход, основанный на формировании монослоёв монокарбоксилатов бария непосредственно на поверхности МАЛДИ-мишени при использовании технологии Ленгмюра, что позволило значительно увеличить чувствительность анализа СЖК в виде их бариевых солей методом МАЛДИ-МС [4]. Предложенный подход ввиду высокой чувствительности и экспрессности представляется перспективным при сравнительном анализе большого количества серий биологических образцов различной природы.

Цель исследования состояла в обобщении известных данных о применении технологии Ленгмюра для качественного и полуколичественного анализа свободных жирных кислот в виде их бариевых солей

методом МАЛДИ-МС в монослоях, сформированных непосредственно на поверхности МАЛДИ-мишени.

Данное исследование является подготовительным этапом по выполнению научно-исследовательской работы по изучению метаболического синдрома в условиях светового десинхроноза.

СЖК в организме служат важным источником энергии, а также могут выступать в роли сигнальных молекул в различных клеточных процессах, в частности секреции инсулина [3]. Однако содержание их внутри организма невелико ввиду того, что они являются детергентами, а повышение их концентрации может приводить к возникновению токсических эффектов [5]. Это позволяет рассматривать СЖК как потенциальные биомаркеры при диагностике различных метаболических заболеваний, в т. ч. метаболического синдрома в условиях светового десинхроноза.

Введение в состав молекулы атома бария (получение соли СЖК) позволяет сдвинуть m/z аналита на 137 ед. в область более высоких значений m/z . Кроме того, барий обладает большим ионным радиусом, что определяет выраженный ионный характер связи в его соединениях и имеет характерное изотопное распределение, упрощающее идентификацию соединений, имеющих в своём составе этот элемент.

Формирование монослоёв монокарбоксилатов бария осуществляется в ходе реакции на границе раздела водной и органической фаз. На первой стадии на ячейку мишени из нержавеющей стали с полированной поверхностью наносят каплю водной субфазы (водный раствор ацетата бария с добавлением матрицы, 2,5-дигидроксibenзойной кислоты) объёмом 0,6 мкл. Затем на поверхность водной капли наносят равный объём n -гексанового экстракта из биологического образца, содержащего СЖК, дожидаются испарения органической фазы и после на-

носят ещё одну порцию экстракта. После полного испарения органической фазы на поверхности ячейки МАЛДИ-мишени образуются монослои с упорядоченной структурой. На последнем этапе пробоподготовки образовавшиеся монослои обрабатывают с помощью 90% водного ацетонитрила для удаления с поверхности излишков матрицы и других гидрофильных примесей. Важно отметить, что образование монослоя происходит в условиях, не приводящих к расщеплению липидов, следовательно, связанные жирные кислоты не участвуют в формировании монослоя.

Рассматриваемый подход ранее был оптимизирован для проведения широкоформатных исследований путём введения процедуры автоматической регистрации масс-спектров, что позволило повысить воспроизводимость результатов [1]. Оптимизированная методика была успешно апробирована при исследовании хронического отравления крыс ацетатом ртути. Было установлено, что в плазме крови крыс, подвергшихся интоксикации, наблюдались значимые ($p < 0,05$) изменения в относительном содержании ряда СЖК. Таким образом, оптимизированный подход может быть эффективно использован в биологических экспериментах, требующих значительное количество как экспериментальных, так и технических повторов.

Выводы

1. Обобщены данные о методах формирования монослоёв бариевых солей амфифильных соединений на поверхности МАЛДИ-мишени за счёт адаптации технологии Ленгмюра к полусферической поверхности водной субфазы для дальнейшего масс-спектрометрического анализа, что позволяет сократить время пробоподготовки и увеличить чувствительность анализа амфифильных соединений методом МАЛДИ-МС.

2. Нанесение смеси свободных жирных кислот в н-гексане приводит к образованию регулярного монослоя монокарбоксилатов бария, что позволяет проводить

профилирование свободных жирных кислот методом МАЛДИ-МС с высокой чувствительностью, точностью и воспроизводимостью.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Гладчук А.С., Батоцыренова Е.Г., Подольская Е.П. Оптимизация методики анализа свободных жирных кислот с помощью комбинации МАЛДИ-масс-спектрометрии и технологии получения монослоев Ленгмюра. *Научное приборостроение*. 2020;30(1):39–49. [Gladchuk A.S., Batotsyrenova E.G., Podolskaya E.P. Optimizatsiya metodiki analiza svobodnykh zhirnykh kislot s pomoshch'yu kombinatsii MALDI-mass-spektrometrii i tekhnologii polucheniya monosloev Lengmyura [Optimization of the method for analysis of free fatty acids using the combination of MALDI mass spectrometry and Langmuir monolayers technology]. *Nauchnoe priborostroenie* [Scientific Instrumentation]. 2020;30(1):39–49. (In Russian)]. DOI: 10.18358/np-30-1-134]
2. Engel K.M., Prabutzki P., Leopold J., Nimptsch A., Lemnitzer K., Vos D.R.N., Hopf C., Schiller J. A new update of MALDI-TOF mass spectrometry in lipid research. *Prog. Lipid Res.* 2022;86:101145. DOI: 10.1016/j.plipres.2021.101145
3. Itoh Y., Kawamata Y., Harada M., Kobayashi M., Fujii R., Fukusumi S., Ogi K., Hosoya M., Tanaka Y., Uejima H., Tanaka H., Maruyama M., Satoh R., Okubo S., Kizawa H., Komatsu H., Matsumura F., Noguchi Y., Shinohara T., Hinuma S., Fujisawa Y., Fujino M. Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40. *Nature*. 2003;422(6928):173–176. DOI: 10.1038/nature 01478
4. Podolskaya E.P., Gladchuk A.S., Keltsieva O.A., Dubakova P.S., Silyavka E.S., Lukasheva E., Zhukov V., Lapina N., Makhmalieva M.R., Gzgyan A.M., Sukhodolov N.G., Krasnov K.A., Selyutin A.A., Frolov A. Thin film chemical deposition techniques as a tool for fingerprinting of free fatty acids by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chem.* 2019;91(2):1636–1643. DOI: 10.1021/acs.analchem.8b05296
5. Schiffelers S., Saris W., van Baak M. The effect of an increased free fatty acid concentration on thermogenesis and substrate oxidation in obese and lean men. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 2001;25(1):33–38. DOI: 10.1038/sj.ijo.0801528

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Гладчук Алексей Сергеевич, к.т.н., ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии им. академика С.Н. Голикова ФМБА России», ФГБУН Институт аналитического приборостроения РАН;
e-mail: aleglad24@gmail.com

Вариошкин Павел Николаевич*, ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии им. академика С.Н. Голикова ФМБА России»;
e-mail: varioshkin.p.n@toxicology.ru

Батоцыренова Екатерина Геннадьевна, к.б.н., доц., ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии им. академика С.Н. Голикова ФМБА России», ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России;
e-mail: bkaterina2009@yandex.ru

Alexey S. Gladchuk, Cand. Sci. (Tech.), Golikov Research Center of Toxicology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia, Institute for Analytical Instrumentation of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: aleglad24@gmail.com

Pavel N. Varioshkin*, Golikov Research Center of Toxicology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: varioshkin.p.n@toxicology.ru

Ekaterina G. Batotsyrenova, Cand. Sci. (Biol.), Assoc. Prof., Golikov Research Center of Toxicology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia, Saint Petersburg State Pediatric Medical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: bkaterina2009@yandex.ru

Калниния Яна Константиновна, ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии им. академика С.Н. Голикова ФМБА России», ФГБУН Институт аналитического приборостроения РАН;

e-mail: kln.yana.k@gmail.com

Yana K. Kalninia, Golikov Research Center of Toxicology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia, Institute for Analytical Instrumentation of the Russian Academy of Sciences;

e-mail: kln.yana.k@gmail.com

Золотоверхая Екатерина Андреевна, к.б.н., ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии им. академика С.Н. Голикова ФМБА России»;

e-mail: e.zolotoverkhaja@yandex.ru

Ekaterina A. Zolotoverkhaya, Cand. Sci. (Biol.), Golikov Research Center of Toxicology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: e.zolotoverkhaja@yandex.ru

Андреева Арина Валерьевна, ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии им. академика С.Н. Голикова ФМБА России»;

e-mail: andreevarina98@mail.ru

Arina V. Andreeva, Golikov Research Center of Toxicology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: andreevarina98@mail.ru

Подольская Екатерина Петровна, д.т.н., ФГБУН Институт аналитического приборостроения РАН;

e-mail: ek.podolskaya@gmail.com

Ekaterina P. Podolskaya, Dr. Sci. (Tech.), Institute for Analytical Instrumentation of the Russian Academy of Sciences;

e-mail: ek.podolskaya@gmail.com

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

<https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-35-37>



ОРТОТОПИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ГЛИОБЛАСТОМЫ ЧЕЛОВЕКА

Н.А. Горячева^{1,2}

¹ Пушчинский филиал ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет»
142290, Российская Федерация, Московская обл., Пушкино, просп. Науки, 3

² Филиал ФГБУН ГНЦ РФ Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН
142290, Российская Федерация, Московская обл., Пушкино, просп. Науки, 6

Изучен опухолевый потенциал клеток глиобластомы человека A172, U251 и U87 у мышей линии NOD-scid.

Ключевые слова: глиоблостома, мыши NOD-scid, модель *in vivo*

Конфликт интересов: автор заявил об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Горячева Н.А. Ортотопическая модель глиобластомы человека. *Биомедицина*. 2024;20(3E):35–37. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-35-37>

Поступила 15.04.2024

Принята после доработки 22.07.2024

Опубликована 01.11.2024

ORTHOTOPIC MODEL OF HUMAN GLIOBLASTOMA

Natalya A. Goryacheva^{1,2}

¹ Pushchino Branch of the Russian Biotechnological University
142290, Russian Federation, Moscow Region, Pushchino, Nauki Ave., 3

² Branch of the Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry
of the Russian Academy of Sciences
142290, Russian Federation, Moscow Region, Pushchino, Nauki Ave., 6

The tumorigenic potential of A172, U251, and U87 glioblastoma cells has been studied in mice of the NOD-scid line.

Keywords: glioblastoma, NOD-scid mice, *in vivo* model

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

For citation: Goryacheva N.A. Orthotopic Model of Human Glioblastoma. *Journal Biomed.* 2024;20(3E): 35–37. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-35-37>

Submitted 15.04.2024

Revised 22.07.2024

Published 01.11.2024

Введение

Глиобластома является крайне агрессивным и наиболее часто встречающимся типом опухолей головного мозга. Несмотря на огромные усилия, в настоящее время не найдено эффективного терапевтического режима, позволяющего вылечить пациентов с глиобластомами [1]. Разработка новых методов лечения зависит от воспроизводимых и надёжных моделей для доклинических, в т. ч. и *in vivo*, исследований [4].

Целью данного исследования являлось изучение опухолеобразующей активности клеток глиобластомы человека A172, U251 и U87 у мышей линии NOD-scid.

Материалы и методы

Дизайн исследования соответствовал биоэтическим требованиям по работе с лабораторными животными. Все манипуляции проводили согласно протоколу-заявке на животных, эксперимент рассмотрен и одобрен Институтской комиссией по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных ФИБХ РАН. Исследование было выполнено на самцах мышей линии NOD-scid SPF-статуса в возрасте 6–9 недель.

Для моделирования опухолевого процесса в мозге животных использовали три клеточные линии глиобластомы человека — A172, U251 и U87. Клетки культивировали в подходящих ростовых средах при стандартных условиях. Инокуляцию клеток проводили следующим образом: в полосатое тело правого полушария головного мозга вводили суспензию клеток в дозах, ранее описанных в литературе: U87 — 500 тыс. клеток/животное [2], A172 — 630 тыс. клеток/животное, U251 — 700 тыс. клеток/животное [3]. Объём введения составлял 10 мкл/животное.

В ходе исследования у животных проводили клинический осмотр. Животные в тяжёлом состоянии были подвергнуты не-

кропсии с последующим макроскопическим и гистологическим анализом головного мозга. Кроме того, была проведена оценка выживаемости животных в течение исследования. Результат рассчитывали как процент выживаемости от общего количества животных.

Результаты исследований

В течение исследования клинический осмотр мышей с привитыми клетками линии A172 и U251 не выявил отклонений в состоянии здоровья, выживаемости, макроскопических изменений головного мозга также не наблюдалось. При этом ксенотрансплантация клеточной линии U87 вызвала тяжёлое состояние животных и снижение выживаемости, которое было выявлено, начиная с 19-го дня после прививки у некоторых мышей, что впоследствии также наблюдалось в разные дни и у других животных, вплоть до 30-го дня исследования.

При макроскопическом анализе головного мозга было выявлено значительное увеличение правой корковой структуры мозга с прорастанием опухоли во внутренние слои у мышей, которым вводили 3-й пассаж клеточной линии U87. У животных, которым были инокулированы клетки U87 6-го пассажа, опухоль распространилась в субарахноидальное пространство. Данные изменения наблюдались в различной степени у всех животных, подвергнутых некропсии.

Микроскопический анализ образовавшейся глиомы выявил два преобладающих паттерна роста: субарахноидальное распространение (при введении клеток 6-го пассажа) и внутримозговое (при введении клеток 3-го пассажа).

Выводы

1. Показано, что опухоленными свойствами у мышей линии NOD-Scid, полученных из Питомника лабораторных животных ФИБХ РАН, в дозах, описанных в литературе, обладает только клеточная линия глиобластомы человека U87. Привить клеточную

линию U251 в дозах, описанных в литературе, животным, выращенным в Питомнике лабораторных животных ФИБХ РАН, не удалось. Подтверждено отсутствие опухолевого потенциала у линии A172.

2. Обнаружено изменение характера роста опухоли в зависимости от пассажа клеточной линии U87. Изучение природы данного явления требует дальнейших исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Генс Г.П., Санников В.Д., Милейко В.А., Лебедева А.А. Глиобластома: молекулярно-генетический портрет и современные терапевтические стратегии лекарственного лечения. *Успехи молекулярной онкологии*. 2021;8(3):60–76. [Gens G.P., Sanikovich V.D., Milejko V.A., Lebedeva A.A. Glioblastoma: molekulyarno-geneticheskiy portret i sovremennye terapevticheskie strategii lekarstvennogo lecheniya [Glioblastoma: A molecular genetic portrait and modern therapeutic strategies for drug treatment]. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* [Advances in Molecular Oncology]. 2021;8(3):60–76. (In Russian)]. DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-3-60-76
2. Завьялов Е.Л., Разумов И.А., Герлинская Л.А., Ромашенко А.В. *In vivo* МРТ-визуализация динамики развития глиобластомы U87 в модели ортотопической ксенотрансплантации мышам линии SCID. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2015;19(4):460–465. [Zavjalov E.L., Razumov I.A., Gerlinskaya L.A., Romashchenko A.V. *In vivo* MRT-vizualizatsiya dinamiki razvitiya glioblastomy U87 v modeli ortotopicheskoy ksenotransplantatsii mysham linii SCID [In vivo MRI visualization of growth and morphology in the orthotopic xenotransplantation U87 glioblastoma mouse SCID model]. *Vavilovskiy zhurnal genetiki i seleksii* [Vavilov Journal of Genetics and Breeding]. 2015;19(4):460–465. (In Russian)]. DOI: 10.18699/VJ15.061
3. Carlson B.L., Pokorny J.L., Schroeder M.A., Sarkaria J.N. Establishment, maintenance and *in vitro* and *in vivo* applications of primary human glioblastoma multiforme (GBM) xenograft models for translational biology studies and drug discovery. *Curr. Protoc. Pharmacol.* 2011;Chapter 14(14):Unit 14.16. DOI: 10.1002/0471141755.ph1416s52
4. Rong L., Li N., Zha Z. Emerging therapies for glioblastoma: Current state and future directions. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2022;41(1):142. DOI: 10.1186/s13046-022-02349-7

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРЕ | INFORMATION ABOUT THE AUTHOR

Горячева Наталья Александровна, Пушкинский филиал ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет», Филиал ФГБУН ГНЦ РФ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН;
e-mail: natasha.goryacheva2017@yandex.ru

Natalya A. Goryacheva, Pushchino Branch of the Russian Biotechnological University, Branch of the Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: natasha.goryacheva2017@yandex.ru

МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ АДАПТАЦИЯ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОЙ ПИЩЕВОЙ ДЕПРИВАЦИИ

Ю.В. Гурман¹, Н.С. Тропская^{1,2,*}, Е.В. Клычникова¹

¹ ГБУЗ г. Москвы «Научно-исследовательский институт скорой помощи
им. Н.В. Склифосовского ДЗМ»
129090, Российская Федерация, Москва, Б. Сухаревская пл., 3

² ФГБОУ ВО «Московский авиационный институт (национальный исследовательский университет)»
125993, Российская Федерация, Москва, Волоколамское ш., 4

Исследования выполнены на 29 крысах-самцах популяции линий Wistar. В экспериментах установлено, что пищевая депривация в течение 9 дней со свободным доступом к воде сопровождается потерей 24% массы тела и вызывает гипертрофию надпочечников и инволюцию тимуса. При этом наблюдалось стадийное изменение показателей белкового, углеводного и жирового обмена, связанное со сменой энергетических субстратов.

Ключевые слова: пищевая депривация, обмен веществ, крысы

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Гурман Ю.В., Тропская Н.С., Клычникова Е.В. Метаболическая адаптация при длительной пищевой депривации. *Биомедицина*. 2024;20(3E):38–41. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-38-41>

Поступила 15.04.2024

Принята после доработки 03.06.2024

Опубликована 01.11.2024

METABOLIC ADAPTATION DURING LONG-TERM FOOD DEPRIVATION

Yulia V. Gurman¹, Nataliya S. Tropaskaya^{1,2,*}, Elena V. Klychnikova¹

¹ N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine of the Moscow Health Care Department
129090, Russian Federation, Moscow, Bolshaya Sukharevskaya Sq., 3

² Moscow Aviation Institute (National Research University)
125993, Russian Federation, Moscow, Volokolamskoe Highway, 4

A series of studies performed on 29 male Wistar rats found that food deprivation for 9 days with free access to water is accompanied by a loss of 24% in body weight, while causing hypertrophy of the adrenal glands and involution of the thymus. At the same time, gradual changes in the indicators of protein, carbohydrate, and fat metabolism were observed, associated with changes in energy substrates.

Keywords: food deprivation, metabolism, rats

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

For citation: Gurman Yu.V., Tropaskaya N.S., Klychnikova E.V. Metabolic Adaptation During Long-Term Food Deprivation. *Journal Biomed*. 2024;20(3E):38–41. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-38-41>

Submitted 15.04.2024

Revised 03.06.2024

Published 01.11.2024

Введение

Проблема влияния голодания на разные показатели обменных процессов в организме животных и человека продолжает привлекать внимание большого числа исследователей [3]. Длительное голодание является фактором, определяющим глубокие метаболические и физиологические изменения, направленные на компенсацию дефицита нутриентов в организме. Теоретический интерес изучения полного голодания связан с возможностью изучения на его примере адаптации организма к условиям эндогенного питания. С практической точки зрения понимание метаболических нарушений при длительном голодании является актуальным, поскольку во многих странах в условиях природных и социальных бедствий и конфликтов увеличивается количество алиментарно-зависимых заболеваний.

Цель работы — изучить основные параметры метаболизма при длительной пищевой депривации в эксперименте.

Материалы и методы

Исследования выполнены на 29 крысах-самцах популяции линий Wistar массой тела 340–390 г в возрасте 12 мес. Протокол исследования был одобрен локальным комитетом по биомедицинской этике НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ.

Все животные содержались в лаборатории в контролируемых условиях окружающей среды при температуре 20–24°C и влажности 45–65%, с режимом освещения с 8.00 до 20.00 ч — свет, с 20.00 до 8.00 ч — сумеречное освещение. Доступ к корму и воде до начала экспериментов был свободным. За 7 сут до начала экспериментов в тощую кишку устанавливали зонд.

Крысы ($n=21$) подвергались пищевой депривации (ПД) в течение 9 дней со свободным доступом к воде. Также была сформирована интактная группа ($n=8$).

Животных ежедневно взвешивали. Крыс выводили из эксперимента летальной дозой наркоза по 7 животных на 4-е, 7-е и 10-е сут от начала ПД. Выделяли надпочечники и тимус для определения их относительных масс, а также для биохимического анализа производился забор крови. Биохимический анализ в сыворотке крови выполнялся на биохимическом анализаторе AU 2700 («Beckman Coulter», США) с применением реактивов фирмы-производителя.

Данные представлялись в виде медианы и перцентилей. Для статистического анализа использовали непараметрические критерии. Статистически значимыми считались различия при $p<0,05$.

Результаты и их обсуждение

На протяжении ПД у всех крыс было выявлено стремительное снижение массы тела. Так, к 4-м сут животные теряли 8 (7; 16) % массы тела, к 7-м — 14 (13; 25) %, а к 10-м сут масса тела животных снизилась на 24 (20; 25) % от исходной.

В отношении органов-маркеров стресса было выявлено нарастающее к 10-м сут повышение относительной массы надпочечников, превышающее в 3 раза уровень у интактных крыс ($p<0,05$). При этом относительная масса тимуса на 4-е и 7-е сут ПД оставалась стабильной, а к 10-м сут наблюдалось её статистически значимое снижение на 37,5% относительно интактных животных.

При ПД у животных наблюдались значительные метаболические изменения по сравнению с интактной группой (табл.). Так, к 7-м сут наблюдалось снижение уровня основного метаболита углеводного обмена — глюкозы — в 1,4 раза, однако к 10-м сут её уровень возвращался к норме. Кроме того, при ПД к 4-м сут наблюдалось понижение уровня общего белка на 10% ($p<0,05$), после чего в последующие дни ПД его уровень не изменялся. Показатели жирового обмена значительно снижались

Таблица. Изменения основных метаболических показателей в разные сроки пищевой депривации, Me (Q1; Q3)
Table. Changes in the basic metabolic parameters at different periods of food deprivation, Me (Q1; Q3)

Группы		Показатели обмена			
		Углеводный обмен	Белковый обмен		Жировой обмен
		Глюкоза	Общий белок	Триглицериды	Холестерин
Интактная группа		9,52 (8,59; 10,5)	67,2 (65,6; 68,9)	0,89 (0,71; 1,13)	1,93 (1,68; 2,30)
Опытная группа	4-е сут	7,29* (6,09; 7,89)	61,0* (60,1; 62,7)	0,37* (0,32; 0,42)	1,26* (1,10; 1,37)
	7-е сут	6,78* (5,07; 7,18)	61,7* (60,1; 63,1)	0,43* (0,37; 0,55)	0,98* (0,92; 1,33)
	10-е сут	9,81 (6,58; 10,30)	59,6* (52,6; 70,0)	0,24* (0,22; 0,24)	1,05* (0,91; 1,53)

Примечание: * — $p < 0,05$ по сравнению с интактной группой.

Note: * — $p < 0,05$ compared to the intact group.

от 4-х к 10-м сут. Так, к 10-м сут наблюдалось снижение триглицеридов и холестерина в 3,7 и 1,8 раза ($p < 0,05$) соответственно.

Таким образом, длительное голодание можно рассматривать как одну из разновидностей стресса, что подтверждается характерными для состояния функционального напряжения организма метаболическими перестройками, происходящими в ответ на лишение его пищи. Наши данные показали, что длительная ПД у крыс вызывает изменения в органах-маркерах стресса, а именно гипертрофию надпочечников и инволюцию тимуса. Выявлены метаболические изменения, такие как снижение уровня глюкозы в крови до 7-х сут, однако к 10-м сут её уровень возвращался к нормальным значениям, что на фоне длительной ПД может быть связано инициированием глюконеогенеза [2], а также с повышением интенсивности фосфорилиза в ответ на повышение выработки АКТГ [1]. Наблюдалось переключение энергетического метаболизма с углеводного на жировой, что сопровождалось сниже-

нием показателей липидного обмена. Это, вероятно, связано с окислением жирных кислот и индукцией гликосилатного цикла [4]. Данная адаптационная перестройка необходима для поддержания энергии и уровня углеводов, а также сохранения структурных белков организма. Таким образом, при голодании наблюдается перераспределение энергетических субстратов в организме: глюкоза поступает в глюкозозависимые ткани, в частности в ЦНС, а остальные органы и ткани организма обеспечиваются энергией благодаря мобилизации жиров.

Выводы

1. Пищевая депривация в течение 9 дней со свободным доступом к воде сопровождается потерей 24% массы тела и вызывает гипертрофию надпочечников и инволюцию тимуса.

2. При пищевой депривации наблюдается стадийное изменение показателей белкового, углеводного и жирового обмена, связанное со сменой энергетических субстратов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Дерхо М.А., Серeda Т.И. Влияние металлотороксикоза и вибрационного стресса на состояние углеводного обмена в организме мышей. *Известия Оренбургского государственного аграрного университета*. 2016;1(57):72–75. [Derkho M.A., Sereda T.I. Vliyanie metallotoksikoza i vibratsionno-gosto stressa na sostoyanie uglevodnogo obmena v orga-

nizme myshey [The influence of metal toxicosis and vibration stress on the state of carbohydrate metabolism in mice]. *Izvestiya Orenburgskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta* [Izvestia of Orenburg State Agrarian University]. 2016;1(57):72–75. (In Russian)].
2. Епринцев А.Т., Шевченко М.Ю., Попов В.Н. Углеводный метаболизм в печени крыс при пи-

- щевой депривации и экспериментальном диабете. *Известия Российской академии наук. Серия биологическая*. 2008;1:115–118. [Eprintsev A.T., Shevchenko M.Yu., Popov V.N. Uglevodnyy metabolizm v pecheni kry's pri pishchevoy deprivatsii i eksperimental'nom diabete [Carbohydrate metabolism in the liver of rats under food deprivation and experimental diabetes]. *Izvestiya Rossiyskoy akademii nauk. Seriya biologicheskaya* [News of the Russian Academy of Sciences. Biological Series]. 2008;1:115–118. (In Russian)].
3. Кузьменко Д.И., Удинцев С.Н., Серебров В.Ю., Климентьева Т.К. *Биохимия голодания и ожирения: новые аспекты и перспективы*. Томск: СибГМУ, 2014. [Kuz'menko D.I., Udintsev S.N., Serebrov V.Yu., Kliment'eva T.K. *Biokhimiya golodaniya i ozhireniya: novye aspekty i perspektivy* [Biochemistry of starvation and obesity: New aspects and prospects]. Tomsk: SibGMU Publ., 2014. (In Russian)].
4. Нихаев Л.Е. Липидный обмен как стабилизирующий фактор. *Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов*. 2019;21:161–166. [Nikhaev L.E. Lipidnyy obmen kak stabiliziruyushchiy factor [Lipid metabolism as a stabilizing factor]. *Organizatsiya i regul'yatsiya fiziologo-biokhimi-cheskikh protsessov* [Organization and Regulation of Physiological and Biochemical Processes. 2019;21:161–166. (In Russian)].

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Гурман Юлия Валерьевна, ГБУЗ г. Москвы «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗМ»;
e-mail: julka_gurman95@mail.ru

Yulia V. Gurman, N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine of the Moscow Health Care Department;
e-mail: julka_gurman95@mail.ru

Тропская Наталия Сергеевна*, д.б.н., ГБУЗ г. Москвы «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗМ»; ФГБОУ ВО «Московский авиационный институт (национальный исследовательский университет)»;
e-mail: ntropskaya@mail.ru

Nataliya S. Tropskaya*, Dr. Sci. (Biol.), N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine of the Moscow Health Care Department; Moscow Aviation Institute (National Research University);
e-mail: ntropskaya@mail.ru

Клычникова Елена Валерьевна, к.м.н., ГБУЗ г. Москвы «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗМ»;
e-mail: klychnikovae@mail.ru

Elena V. Klychnikova, Cand. Sci. (Med.), N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine of the Moscow Health Care Department;
e-mail: klychnikovae@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

ЗАВИСИМОСТЬ АНТИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА МОЛОДНЯКА ОВЕЦ ОТ СПОСОБА ИММУНИЗАЦИИ РЕКОМБИНАНТНЫМ МИОСТАТИНОМ

В.А. Езерский, Е.М. Колоскова*

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

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

Несмотря на успехи в создании генно-модифицированных животных с новыми хозяйственно-полезными признаками, иммунобиотехнологические методы представляют собой альтернативный, более традиционный и безопасный для здоровья животного способ повышения мясной продуктивности сельскохозяйственных животных. Например, животные с нокаутом гена *MSTN* имеют не только чрезмерно развитую мускулатуру, но и серьезные проблемы со здоровьем и воспроизводством. Блокировка действия эндогенного миостатина иммунными методами в фазе интенсивного роста животных может оказаться способом, востребованным для эффективного животноводства. В настоящее время для иммунизации в качестве антигенов всё чаще используют очищенные рекомбинантные белки и пептиды, обладающие низкой собственной иммуногенностью. Эффективность создаваемых вакцин зависит не только от используемого антигена, но и адъювантов, способов её введения, вида животных и определяется в основном эмпирически. Нами был получен штамм-продуцент рекомбинантного миостатина (рМСТ), белок был использован в качестве антигена в композиции с разными адъювантами для определения его иммуногенности. С гелем гидроксида алюминия в качестве адъюванта рМСТ был использован в качестве вакцины для иммунизации 4-месячных ягнят. Было показано, что однократная подкожная многоточечная иммунизация в дозировке 1 мг рМСТ/гол. приводила к осязаемому иммунному ответу и приросту живой массы.

Ключевые слова: рекомбинантный миостатин, иммунизация, ягнята, титр антител, ИФА, прирост живой массы

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: работа выполнена в рамках государственного задания № 0445-2021-0002.

Для цитирования: Езерский В.А., Колоскова Е.М. Зависимость антительного ответа молодняка овец от способа иммунизации рекомбинантным миостатином. *Биомедицина*. 2024;20(3E):42–48. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-42-48>

Поступила 10.04.2024

Принята после доработки 03.06.2024

Опубликована 01.11.2024

DEPENDENCE OF THE ANTIBODY RESPONSE OF YOUNG SHEEP ON THE METHOD OF IMMUNIZATION WITH RECOMBINANT MYOSTATIN

Vadim A. Ezerskiy, Elena M. Koloskova*

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

Despite the success in creating genetically modified animals with improved economic characteristics, immunological biotechnologies represent an alternative, more conventional and safer, approach to increasing the meat productivity of farm animals. For example, animals with a knockout of the *MSTN* gene have not only overly developed muscles, but also serious health and reproduction problems. Blocking the action of endogenous myostatin by immune methods in the phase of intensive animal growth may become a high-tech and safe method for effective animal husbandry. Currently, purified recombinant proteins and peptides with a low intrinsic immunogenicity are increasingly used as antigens for immunization. The effectiveness of the created vaccines depends not only on the antigen used, but also on the methods of its administration, adjuvants, and the type of animals, being determined, as a rule, empirically. We obtained a recombinant myostatin (rMST) producing strain; the protein was used as an antigen in a composition with various adjuvants to determine its immunogenicity. The obtained rMST, along with aluminum hydroxide gel as an adjuvant, was used as a vaccine to immunize four-month-old lambs. It was shown that a single subcutaneous multipoint immunization at a dosage of 1 mg rMST per head led to a noticeable immune response and an increase in body weight.

Keywords: recombinant myostatin, immunization, vaccine, lambs, antibody titer, ELISA, live weight gain

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

Funding: the work was performed in the framework of State Project No. 0445-2021-0002.

For citation: Ezerskiy V.A., Koloskova E.M. Dependence of the Antibody Response of Young Sheep on the Method of Immunization with Recombinant Myostatin. *Journal Biomed.* 2024;20(3E):42–48. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-42-48>

Submitted 10.04.2024

Revised 03.06.2024

Published 01.11.2024

Введение

Мясное животноводство, в т. ч. овцеводство, — важнейшая отрасль сельского хозяйства. Повышение продуктивности и улучшение качества мяса — приоритетное направление развития отрасли. Растёт доля специализированных мясных пород, на молекулярно-генетическом уровне ведётся поиск генов и их полиморфизмов, связанных с развитием роста-весовых признаков. Белок миостатин (МСТ), продукт экспрессии гена *MSTN*, ингибирует синтез белков в мышцах, дифференцировку и пролиферацию миоцитов [6]. Определены полиморфизмы гена *MSTN*, приводящие к отсутствию белка или ограничению его функциональной активности. Острый интерес вызывает возможность геномного редактирования — нокаут гена, позволяю-

щий получать животных с эффектом «двойной мускулатуры». Однако у таких животных приобретённые качества, как правило, сопровождаются уменьшением размеров жизненно важных органов (сердца, лёгких, почек), хрупкостью костей задних конечностей, у них увеличивается восприимчивость к респираторным и прочим заболеваниям, нарушаются воспроизводительные функции (повышались эмбриональная смертность, число аборт и мёртворождений) [5].

В настоящее время активно разрабатываются способы ингибирования активности МСТ на разных уровнях [7], но для практического применения в животноводстве, ограниченном жёсткими требованиями к применению гормональных препаратов, антибиотиков, стероидов, могут оказаться предпочтительными иммунобиотехноло-

гические методы — например, системное введение антител против МСТ или возможность использования рекомбинантного МСТ (рМСТ) в качестве антигена для индукции аутоантительного ответа против эндогенного белка [10, 11]. Поскольку аминокислотная последовательность МСТ идентична у многих видов животных, рМСТ в составе вакцин может быть эффективен для повышения мясной продуктивности сельскохозяйственных животных и птицы.

С использованием оптимизированной для трансляции в бактериальных культурах нуклеотидной последовательности, кодирующей зрелый белок миостатина овцы (*Ovis aries*), нами был создан штамм-продуцент *E. coli* / *pET-MSTN*, иммуногенность рМСТ была подтверждена при вакцинации им кроликов и овец с использованием нескольких адъювантов [2, 3]. Слабая или практически отсутствующая иммуногенность хорошо очищенных рекомбинантных белков антигенов, аминокислотная последовательность которых идентична эндогенному белку, нуждается в усилении адъювантами. Иммунный ответ зависит от свойств антигена, видовых и индивидуальных особенностей организма, способов и схем иммунизации. Оптимизация иммунного ответа, как правило, достигается опытным путём [1]. Несмотря на относительно низкий, по сравнению с полным и неполным адъювантами Фрейнда, антительный ответ, для практической работы с рМСТ нами в качестве адъюванта был выбран наиболее широко применяемый гель гидроксида алюминия [2, 3]. Его адъювантная активность проявляется в способности адсорбировать антигены, формировать и медленно реализовать депо антигенов. В области введения адъюванта воспалительные реакции способствуют макрофагальному транспорту антигена к лимфатическим тканям, происходит комплекс реакций клеточного и гуморального иммунитета с продукцией иммуноглобулинов классов Е и G [1, 4, 8].

В качестве основного метода вакцинации обычно применяют внутримышечные инъекции, но адъювантные белковые вакцины, вводимые в слизистые оболочки или подкожно, индуцируют более выраженный гуморальный и клеточный иммунитет [9]: выбор способа введения вакцины может быть критичным фактором для слабых антигенов.

Целью нашего исследования была оценка влияния способа вакцинации рМСТ на антительный ответ молодняка овец.

Материалы и методы

Вакцина. Рекомбинантный МСТ в буфере с 8 М мочевиной (5 мг/мл) разводили стерильным физ. р-ром до концентрации 2 мг/мл и смешивали с адъювантом — гелем гидроксида алюминия (ГА) (Щёлковский биокомбинат, Россия), в объёмном соотношении 1:1. Доза вводимого препарата составляла 1 мг рМСТ/гол.

Опытные животные. В эксперименте использовали ягнят (баранчики) меринской породы в возрасте 4 мес. Были сформированы три группы — контрольная (К), животных в которой не иммунизировали, и две опытных группы по 8 гол. в каждой, по принципу парных аналогов. Все животные перед началом эксперимента маркировались с помощью ушных бирок с нанесённым соответствующим номером. Эксперимент проводили в зимний период. Животные содержались в производственном помещении (загон-ферма) частного овцеводческого комплекса (Московская обл.). Кормление осуществлялось по технологической схеме хозяйства, на основном рационе для овец. Вода была в свободном доступе.

Способ иммунизации. Вакцину вводили внутримышечно животным первой опытной группы (ВМ — внутримышечное введение, одноточечно в область холки), подкожно ягням второй опытной группы

(ПК, 3–4 точки в подмышечную область, лишённую плотного шёрстного покрова).

Кровь у ягнят брали из яремной вены с соблюдением правил асептики и антисептики в начале опыта, через 14 и 28 сут после вакцинации. Кровь собирали в вакуумные пробирки РУТН с активатором свёртывания (SiO_2). Сыворотку отделяли от коагулированного сгустка и хранили при -20°C до определения титра антител.

Титр сывороток измеряли с использованием собственной ИФА тест-системы [2, 3], непрямой метод. Анализируемые сыворотки (каждый образец в двух параллелях) в двукратных разведениях от 1:200 до 1:12800 вносили в лунки планшета с иммобилизованным рМСТ. В качестве вторых антител использовали антитела кролика, иммунизированного IgG овцы, меченные пероксидазой хрена (конъюгат «кролик-анти-овца-ПХ»). Пероксидазную активность конъюгата, связавшегося с овечьими антителами, аффинно захваченными иммобилизованным на планшете рМСТ, определяли хромогенной реакцией тетраметилбензидина с перекисью водорода. Реакцию останавливали «стоп-раствором», оптическую плотность измеряли при 450 нм (OP_{450}). Результаты измерений представлены в таблице и на рисунке.

Результаты исследований

Ранее нами в экспериментах на 8-месячных кроликах и взрослых овцах было по-

казано, что рМСТ обладает достаточной иммуногенностью и индуцирует синтез антител. У иммунизированных рМСТ овец по результатам ИФА ОП450 сывороток была в 4–15 раз выше, чем у контрольных. Лучшие результаты были получены при использовании полного и неполного адъюванта Фрейнда (ПАФ и НАФ), ОП450 сывороток животных, вакцинированных с использованием геля гидроксида алюминия в качестве адъюванта, была в 1,5–2 раза ниже (при одинаковых разведениях сывороток). Однако подкожный многоточечный способ вакцинации оказался эффективнее внутримышечного: при разведении сывороток 1:400 ОП450 были 0,84 и 0,56 соответственно, что свидетельствует о лучшем иммунном ответе при подкожном способе введения вакцины [2, 3].

Применение ПАФ в экспериментах на животных ограничено рамками различных нормативных документов. Препарат используется только при первичной иммунизации животных [1]. Адъюванты на основе алюминия находят широкое применение, используются и одобрены FDA (Управление США по надзору за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств) для применения в вакцинах.

В нашем эксперименте по результатам ИФА, выполненного с использованием собственной тест-системы, было показано, что оптическая плотность образцов сывороток ягнят контрольной и опытных групп,

Таблица. Титры антител 4-месячных ягнят контрольной и опытных групп

Table. Antibody titers of four-month-old lambs in the control and experimental groups

Группы	Сутки	Разведения сывороток, OP_{450}			
		1/200	1/400	1/800	1/1600
К	0	0,136	0,103	0,075	0,055
	14	0,106	0,069	0,046	0,042
	28	0,116	0,084	0,059	0,020
ВМ	14	0,300	0,251	0,197	0,154
	28	0,249	0,195	0,156	0,121
ПК	14	0,551	0,487	0,416	0,334
	28	0,477	0,396	0,330	0,247

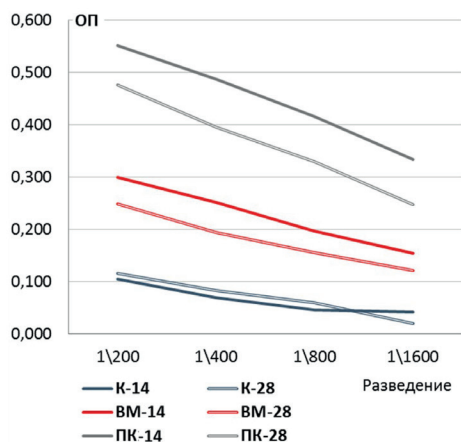


Рис. Зависимость иммунного ответа ягнят от способа иммунизации рМСТ с гелем гидроксида алюминия.
Fig. Dependence of the immune response of lambs on the method of immunization of rMST with aluminum hydroxide gel.

взятых до иммунизации животных, при разведении сывороток 1/400–1/200 находилась в интервале 0,1–0,14 о.е. В таблице и на рисунке приведены данные по титрам антител ягнят контрольной и опытных групп в течение эксперимента.

Титр антител к миостатину у ягнят контрольной группы на протяжении эксперимента оставался постоянным, тогда как у животных опытных групп, относительно высокий на 14-е сут, он снижался к концу эксперимента, оставаясь в несколько раз выше, чем у неиммунизированных ягнят. ОП450 сывороток ПК иммунизированных ягнят была в 2 раза выше, чем при внутримышечной инъекции, что свидетельствует о более высоком содержании антител в сыворотке ягнят, иммунизированных подкожно. Полученные результаты согласуются с другими нашими данными о динамике роста ягнят: живая масса ягнят с высоким титром антител (подкожное введение вакцины) через 28 сут после иммунизации была больше, чем у неиммунизированных.

Закключение

Современные технологии конструирования вакцин включают рекомбинантные, синтетические и другие препараты со слабой иммуногенностью из-за отсутствия или недостаточного содержания в них патоген-ассоциированных структур микроорганизмов, необходимых для взаимодействия с рецепторами клеток системы врождённого иммунитета, запускающих каскад сигналов для активации иммунных реакций. Многочисленные разнообразные адъюванты призваны компенсировать недостаточную иммуногенность антигенов, однако к применению в практике разрешены только соли алюминия и водно-масляная эмульсия MF-59 [4]. Считалось, что гидроксид алюминия, введённый в организм с антигеном, создаёт депо, откуда антиген медленно элиминируется. При этом возникает воспалительный очаг, привлекающий антигенпрезентирующие клетки. Установлено, что гидроксид алюминия действует на ключевые эффекторы врождённого иммунитета: дендритные клетки, NK, TLRs и продукцию цитокинов [4, 8].

Наша вакцина, представляющая собой раствор рМСТ в гидрогеле гидроксида алюминия, оказалась наиболее эффективна при подкожной многоточечной иммунизации: титр антител был выше и коррелировал с ростом ягнят. Титр антител к миостатину, относительно высокий на 14-е сут после иммунизации, уменьшался к 28-м сут: оптическая плотность образцов, определённая методом ИФА, при одинаковом разведении сывороток снижалась на 15–20%. Очевидно, повторная иммунизация животных в этот период привела бы к росту антительного ответа и возможной блокировке эндогенного миостатина, что с большой вероятностью имело бы последствием ускоренный по сравнению с неиммунизированными животными набор мышечной массы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Козлов В.Г., Ожерелков С.В., Санин А.В., Кожевникова Т.Н. Адьюванты в современной медицине и ветеринарии. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2014;1:91–102. [Kozlov V.G., Ozherelkov S.V., Sanin A.V., Kozhevnikova T.N. Ad'yuvanty v sovremennoy meditsine i veterinarii [Adjuvants in modern medicine and veterinary]. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii* [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]. 2014;1:91–102. (In Russian)].
2. Колоскова Е.М., Езерский В.А., Жукова О.Б. Получение бактериального рекомбинантного миостатина для индуцирования синтеза специфических к миостатину аутоантител. *Биомедицина*. 2022;18(3):22–26. [Koloskova E.M., Ezerskiy V.A., Zhukova O.B. Poluchenie bakterial'nogo rekombinantnogo miostatina dlya indutsirovaniya sinteza spetsificheskikh k miostatinu autoantitel [Preparation of bacterial recombinant myostatin to induce the synthesis of myostatin-specific autoantibodies]. *Biomeditsina* [Journal Biomed]. 2022;18(3):22–26. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-18-3-22-26
3. Колоскова Е.М., Езерский В.А. Рекомбинантный миостатин: выделение и использование в вакцинах. *Биомедицина*. 2023;19(3):17–22. [Koloskova E.M., Ezerskiy V.A. Rekombinantnyy miostatin: vydelenie i ispol'zovanie v vaktsinakh [Recombinant myostatin: Isolation and use in vaccines]. *Biomeditsina* [Journal Biomed]. 2023;19(3):17–22. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-19-3-17-22
4. Курбатова Е.А., Ахматов Э.А., Ахматова Н.К., Воробьев Д.С., Егорова Н.Б., Батуро А.П., Романенко Э.Е., Цветков Ю.Е., Сухова Е.В., Яшунский Д.В., Нифантьев Н.Э. Действие гидроксида алюминия на систему врождённого иммунитета и иммуногенность бактериальных и синтетических антигенов *Streptococcus pneumoniae*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2014;6:59–67. [Kurbatova E.A., Akhmatov E.A., Akhmatova N.K., Vorob'ev D.S., Egorova N.B., Batur A.P., Romanenko E.E., Tsvetkov Yu.E., Sukhova E.V., Yashunskiy D.V., Nifant'ev N.E. Deystvie gidroksida alyuminiya na sistemu vrozhdennogo immuniteta i immunogennost' bakterial'nykh i sinteticheskikh antigenov *Streptococcus pneumoniae* [Effect of aluminium hydroxide on innate immunity and immunogenicity of bacterial and synthetic antigens of *Streptococcus pneumoniae*]. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii* [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]. 2014;6:59–67. (In Russian)].
5. Трухачев В.И., Селионова М.И., Криворучко А.Ю., Айбазов А.М. Генетические маркеры мясной продуктивности овец (*Ovis aries* L.). Сообщение I. Миостатин, кальпаин, кальпаастатин. *Сельскохозяйственная биология*. 2018;53(6):1107–1119. [Trukhachev V.I., Selionova M.I., Krivoruchko A.Yu., Aibazov A.M. Geneticheskie markery myasnoy produktivnosti ovets (*Ovis aries* L.). Soobshchenie I. Miostatin, kal'pain, kal'pastatin [Genetic markers of meat productivity of sheep (*Ovis aries* L.). Report I. Myostatin, calpain, calpastatin (review)]. *Sel'skhozyaistvennaya biologiya* [Agricultural Biology]. 2018;53(6):1107–1119. (In Russian)]. DOI: 10.15389/agrobiology.2018.6.1107rus
6. Chen M.M., Zhao Y.P., Zhao Y., Deng S.L., Yu K. Regulation of myostatin on the growth and development of skeletal muscle. *Front. Cell Dev. Biol.* 2021;9:785712. DOI: 10.3389/fcell.2021.785712
7. Nielsen T.L., Vissing J., Krag T.O. Antimyostatin treatment in health and disease: The story of great expectations and limited success. *Cells*. 2021;10(3):533. DOI: 10.3390/cells10030533
8. Shardlow E., Mold M., Exley C. Unraveling the enigma: Elucidating the relationship between the physicochemical properties of aluminium-based adjuvants and their immunological mechanisms of action. *Allergy Asthma Clin. Immunol.* 2018;14:80. DOI: 10.1186/s13223-018-0305-2
9. Su Y., Li D., Xing Y., Wang H., Wang J., Yuan J., Wang X., Cui F., Yin Y., Zhang X. Subcutaneous immunization with fusion protein DnaJ-ΔA146Ply without additional adjuvants induces both humoral and cellular immunity against pneumococcal infection partially depending on TLR4. *Front. Immunol.* 2017;8:686. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00686
10. Xu Y., Mao L., Zheng Y. Prokaryotic expression and immunogenicity analysis of yak recombinant myostatin. *Anim. Biotechnol.* 2012;23(4):253–260. DOI: 10.1080/10495398.2012.722157
11. Zhang T., Yang H., Wang R., Xu K., Xin Y., Ren G., Zhou G., Zhang C., Wang L., Zhang Z. Oral administration of myostatin-specific whole recombinant yeast *Saccharomyces cerevisiae* vaccine increases body weight and muscle composition in mice. *Vaccine*. 2011;29(46):8412–8416. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.08.007

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Езерский Вадим Аркадьевич, Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания животных — филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста»;
e-mail: ez.vadim@yandex.ru

Vadim A. Ezerskiy, All-Russian Research Institute of Physiology, Biochemistry and Animal Nutrition — Branch of the Federal Scientific Centre of Animal Husbandry — All-Russian Institute of Animal Husbandry named after Academician L.K. Ernst;
e-mail: ez.vadim@yandex.ru

Колоскова Елена Михайловна*, к.б.н., Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания животных — филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста»;
e-mail: heleko3@yandex.ru

Elena M. Koloskova*, Cand. Sci. (Biol.), All-Russian Research Institute of Physiology, Biochemistry and Animal Nutrition — Branch of the Federal Scientific Centre of Animal Husbandry — All-Russian Institute of Animal Husbandry named after Academician L.K. Ernst;
e-mail: heleko3@yandex.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

<https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-49-53>



ПОДХОДЫ К ИЗУЧЕНИЮ ОСОБЕННОСТЕЙ ПИЩЕВАРЕНИЯ КАБАРГИ СИБИРСКОЙ В УСЛОВИЯХ ПИТОМНИКА

А.М. Зубалий*, М.М. Гусева

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

Для полноценного кормления кабарги в вольерных условиях необходимы данные о переваримости питательных веществ корма. В работе проведена косвенная оценка особенностей пищеварения кабарги в осенний и зимний периоды. Анализировалось влияние возраста, пола, физиологического состояния и сезона на экскрецию питательных веществ. Наиболее чувствительными являются показатели минерального обмена, особенно фосфора. Также нестабильностью отличается экскреция клетчатки, жира и протеина. Результаты позволяют судить о переваримости корма и обосновывают необходимость балансирующих подкормок для разных половозрастных групп кабарги в вольерных условиях.

Ключевые слова: *Moschus moschiferus*, переваримость, экскреция, органические вещества корма, питательные вещества, биохимический состав, рубцовое пищеварение

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: государственное задание по теме «Разработка концепции и научно-технического обоснования рационального кормления и содержания животных-производителей для получения биологически активных веществ для производства фармацевтических субстанций» (шифр: «Питомник-2») ФГБУН НЦБМТ ФМБА России.

Для цитирования: Зубалий А.М., Гусева М.М. Подходы к изучению особенностей пищеварения кабарги сибирской в условиях питомника. *Биомедицина*. 2024;20(3E):49–53. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-49-53>

Поступила 19.03.2024

Принята после доработки 13.07.2024

Опубликована 01.11.2024

INVESTIGATION OF THE DIGESTION PECULIARITIES OF SIBERIAN MUSK DEER KEPT UNDER FARM CONDITIONS

Anastasiia M. Zubalii*, Mariya M. Guseva

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 order to ensure adequate nutrition of musk deer in captivity, it is essential to have data on the digestibility of feed nutrients. In this work, we carry out an indirect assessment of the digestive characteristics of captive musk deer in the autumn and winter periods. The influence of age, gender, physiological state, and seasonal changes on nutrient excretion is analyzed. The most sensitive parameter was found to be mineral metabolism, phosphorus metabolism in particular. Other unstable parameters include excretion of fiber, fat, and protein. The results obtained provide information on the digestibility of feed and justify the need for balancing feedings for different age and sex groups of musk deer kept under farm conditions.

Keywords: *Moschus moschiferus*, digestibility, excretion, feed organics, nutrients, biochemical composition, ruminal digestion

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

Funding: the research topic “Development of the concept and scientific and technical justification of rational feeding and keeping of producing animals for the production of biologically active substances for the pharmaceutical industry” (code: “Nursery-2”) of state assignment of Scientific Center of Biomedical Technologies of FMBA of Russia.

For citation: Zubalii A.M., Guseva M.M. Investigation of the Digestion Peculiarities of Siberian Musk Deer Kept under Farm Conditions. *Journal Biomed.* 2024;20(3E):49–53. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-49-53>

Submitted 19.03.2024

Revised 13.07.2024

Published 01.11.2024

Введение

Ключевым показателем полноценности рациона является сбалансированность пищевых компонентов, соответствующих потребностям животных [3, 4]. В связи с тем, что рациональное кормление кабарги в вольерных условиях недостаточно изучено, наша работа по сбору и анализу данных и апробации методов кормления кабарги является актуальной.

Для обеспечения полноценности кормления разных половозрастных групп кабарги необходимо учитывать не только количество и питательность кормов, но и переваримость их компонентов. Из-за особенностей нервной системы кабарги классические балансовые опыты трудно провести [2, 4], поэтому биохимический состав экскрементов может служить косвенным показателем оценки функциональных особенностей ЖКТ кабарги в условиях питомника.

Материалы и методы

Для установления влияния различных факторов на экскрецию основных питательных веществ рациона был произведён отбор проб фекалий вольерной кабарги различного возраста, пола и физиологического состояния в осенний и зимний периоды в питомнике филиала «Алтайский» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России (Россия, Республика Алтай). Пробы отбирались два-

жды: в осенний период — в сентябре 2023 г. (15.09.2023 г.) и в зимний период — в феврале 2024 г. (29.02.2024 г.). Биохимический анализ полученных проб проведён в ООО «Клиническая ветеринарная лаборатория» (Калужская обл.). В табличных данных далее приводятся значения массовой доли определяемого вещества/элемента в абсолютно сухом веществе (АСВ), в процентах в виде $M \pm m$. Определялись органические вещества (сырой протеин, сырой жир, сырая клетчатка) и минеральные компоненты (общий азот, сырая зола, кальций, фосфор). Для определения статистической значимости различий использовали U-критерий Манна — Уитни.

Результаты и их обсуждение

Для выявления *влияния физиологического состояния* кабарги на переваримость питательных веществ рациона мы выделили следующие группы животных: самки без детёнышей (т. е. яловые в 2023 г.), самки с детёнышами (т. е. лактирующие в летне-осенний период 2023 г.), все самки и все самцы. При сравнении биохимического состава фекалий животных этих физиологических групп статистически значимых различий по определяемым показателям в осенний период не выявлено.

Для установления *влияния фактора сезонности* на биохимический состав фека-

Таблица 1. Результаты биохимического анализа фекалий самцов и самок кабарги в сезонном аспекте
Table 1. Results of a biochemical analysis of male and female musk deer feces from the seasonal perspective

Группа	п	Общий азот	Сырой протеин	Сырой жир	Сырая клетчатка	Сырая зола	Кальций	Фосфор
Взрослые самки								
Осенний период	6	2,607± 0,0889	16,292± 0,5551	3,380± 0,3789*	5,075± 0,2649	16,100± 0,7081	4,213± 0,4310	0,658± 0,0860*
Зимний период	6	2,278± 0,1261	14,278± 0,7923	4,800± 0,2811	6,001± 0,2790	13,427± 1,1482	4,798± 0,4869	0,233± 0,0167
Взрослые самцы								
Осенний период	5	2,646± 0,1022	16,538± 0,6387	4,354± 0,2132	6,930± 1,2327	14,490± 1,4559	3,842± 0,4951	0,764± 0,1055*
Зимний период	5	2,316± 0,1232	14,566± 0,7854	5,320± 0,6071	5,754± 0,5517	13,948± 0,3987	4,494± 0,5986	0,262± 0,5986

Примечание: * — значимость по критерию Манна — Уитни при $p \leq 0,01$.

Note: * — significance according to the Mann–Whitney criterion at $p \leq 0.01$.

лий кабарги, по которому можно косвенно судить об уровнях экскреции основных веществ рациона, мы сравнивали показатели, полученные от одних и тех же животных в сентябре 2023 г. и в феврале 2024 г. (табл. 1).

Выявлено достоверное снижение массовой доли фосфора в фекалиях кабарги в зимний период в сравнении с осенним — как у самцов, так и самок. У самок было выявлено статистически значимое сезонное увеличение секреции сырого жира в зимний период. На этот факт следует обратить внимание и продолжить сбор эмпирических данных для выявления факторов, влияющих на липидный обмен.

Для выявления **возрастных особенностей** переваримости корма и экскреции основных веществ рациона было проведено сравнение показателей биохимического состава экскрементов кабарги в феврале 2024 г. Были проанализированы данные, полученные в зимний период от взрослых половоз-

релых особей и молодняка 2023 г.р., соответствующего пола. Установлено, что в зимний период различия по биохимическому составу экскрементов как между взрослыми самками и самцами, так и при сравнении разновозрастных групп одного пола не достигают статистически значимых уровней. Это может косвенно свидетельствовать о том, что интенсивность экскреции и переваримость указанных веществ у молодняка кабарги в возрасте 6–7 мес. находится на уровне взрослых животных.

Особенности переваривания и экскреции питательных веществ у **молодняка кабарги в зависимости от пола** приведены в табл. 2. У молодых самцов 2023 г.р., рождённых в питомнике, в сравнении молодыми самками 2023 г.р., рождёнными в питомнике, выявлен достоверно больший уровень экскреции сырого жира. Липидный обмен требует особого внимания, т. к. имеет непосредственное влияние на интенсивность стероидогенеза, обеспечивающего

Таблица 2. Результаты биохимического анализа фекалий молодняка кабарги в зимний период
Table 2. Results of a biochemical analysis of the feces of young musk deer in winter

Группа	п	Общий азот	Сырой протеин	Сырой жир	Сырая клетчатка	Сырая зола	Кальций	Фосфор
Самки, рождены в питомнике	3	2,430± 0,1155	15,250± 0,7304	3,873± 0,2785	6,420± 0,4416	16,127± 1,4896	6,633± 0,2028	0,237± 0,0176
Самцы, рождены в питомнике	3	2,577± 0,0441	16,170± 0,2740	4,740± 0,1646*	5,947± 0,6563	14,803± 0,6479	5,867± 1,0478	0,230± 0,0208

Примечание: * — значимость по критерию Манна — Уитни при $p \leq 0,05$.

Note: * — significance according to the Mann–Whitney criterion at $p \leq 0.05$.

Таблица 3. Результаты биохимического анализа фекалий самцов и самок кабарги в зависимости от предыдущих условий содержания (зимний период)

Table 3. Results of a biochemical analysis of the feces of male and female musk deer, depending on the previous conditions of keeping (winter period)

Группа	n	Общий азот	Сырой протеин	Сырой жир	Сырая клетчатка	Сырая зола	Кальций	Фосфор
Взрослые самки								
Содержащиеся в вольерах больше года	6	2,278±0,1261	14,278±0,7923	4,800±0,2811	6,001±0,2790	13,427±1,1482	4,798±0,4869	0,233±0,0167
Изыятые из природы в декабре 2023 г.	2	2,460±0,2300	15,455±1,4550	5,080±0,1000	8,095±0,1850*	11,700±2,1600	4,890±1,5100	0,370±0,0300*
Взрослые самцы								
Содержащиеся в вольерах больше года	5	2,316±0,1232	14,566±0,7854	5,320±0,6071	5,754±0,5517	13,948±0,3987	4,494±0,5986	0,262±0,5986
Изыятые из природы в декабре 2023 г.	1	2,725↑	17,138↑	5,16	7,23↑	17,15↑	5,90	0,49↑

Примечание: * — значимость по критерию Манна — Уитни при $p \leq 0,05$ (самки, отловленные в природе, в сравнении с вольерными самками); ↑ — показатели выше, чем $M \pm 3m$, по половозрастной группе (самцы, отловленные в природе, в сравнении с вольерными самцами).

Note: * — significance according to the Mann–Whitney criterion at $p \leq 0.05$ (wild-caught females compared to captive females); ↑ — indicators are higher than $M \pm 3m$, by age and sex group (wild-caught males compared to captive males).

посредством нормализации эндокринных функций организма оптимальное состояние здоровья, рост и развитие молодняка, и, в дальнейшем, воспроизводительные функции и секрецию мускуса у взрослых животных. Поскольку в этот показатель могут вносить свой вклад метаболиты стероидных гормонов, то высока вероятность, что он будет зависеть также от индивидуальных особенностей нейрогуморальной регуляции и стресс-чувствительности животных. Этот вопрос требует дальнейшего изучения и разработки с применением других методических подходов.

Для установления возможного **долгосрочного влияния условий кормления и содержания кабарги** на функциональное состояние желудочно-кишечного тракта проведено сравнение экскреции питательных веществ взрослых самцов и самок кабарги, содержащихся в питомнике более года, и особей, изъятых из природы в декабре 2023 г. (табл. 3). На момент отбора проб биоматериалов вновь прибывшие животные находились в питомнике более 2 мес., визуальных отклонений в поедании

корма, поведении и пищеварении у них не наблюдалось. Тем не менее, результаты, приведённые в табл. 3, показывают определённые статистически значимые различия.

Установлено, что экскреция сырой клетчатки и фосфора была снижена как у самок, так и у самцов, содержащихся в условиях питомника более года, в сравнении с вновь прибывшими. Кроме того, у самца, относительно недавно изъятых из природы, отмечалась тенденция к большей экскреции протеина и золы, чем у вольерных. Такие изменения свидетельствуют о возможной нестабильности деятельности рубцовой микрофлоры при изменении условий кормления животных.

Выводы

1. Наиболее чувствительными показателями, характеризующими особенности пищеварения у кабарги в условиях неволи в половозрастном и сезонном аспекте, являются показатели минерального обмена — прежде всего, фосфора и, возможно, кальция. Также нестабильностью отличается экскреция клетчатки, жира и протеина.

2. У особей, которые содержатся в питомнике более года и адаптировались к имеющимся условиям кормления и содержания, наиболее выражено сезонное снижение экскреции фосфора, независимо от пола.

3. У вольерных и недавно изъятых из природы особей кабарги наблюдаются различия в уровнях экскреции клетчатки.

4. Уровень экскреции сырого жира достоверно повышается у взрослых самок в зимний период, а также у молодых самцов в сравнении с молодыми самками.

Полученные результаты позволяют косвенно судить об особенностях переваримости питательных веществ корма у кабарги в условиях питомника. Это может стать обоснованием необходимости тех или иных

балансирующих подкормок для различных половозрастных групп вольерной кабарги. Следует отметить, что кабарга — это жвачное животное с многокамерным желудком, для которой важнейшим компонентом, обеспечивающим нормальное состояние здоровья и физиологических процессов организма, является рубцовое пищеварение [1, 2, 4]. Наблюдаемые нами колебания экскреции различных компонентов корма являются отражением нестабильности деятельности рубцовой микрофлоры при изменении условий кормления животных [3, 5, 6]. В связи с этим требуется дальнейшее изучение данного вопроса для разработки приёмов и методик нормализации пищеварения в преджелудках кабарги.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Доманов Т.А. *Экология кабарги Moschus moschiferus (Linnaeus, 1758) хребта Тукурингра*: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Иркутск, 2013. [Domanov T.A. *Ekologiya kabargi Moschus moschiferus (Linnaeus, 1758) khrebtu Tukuringra* [Ecology of the musk deer Moschus moschiferus (Linnaeus, 1758) of the Tukuringra ridge]: avtoref. dis. ... kand. biol. nauk [Abstract of the Dissertation of Cand. Sci. (Biol.)]. Irkutsk, 2013. (In Russian)].
2. Приходько В.И. *Кабарга: ресурсы, сохранение вида в России*. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2021. [Prihod'ko V.I. *Kabarga: resursy, sohranenie vida v Rossii* [Musk deer: Resources, conservation of the species in Russia]. Moscow: Tovarishchestvo nauchnykh izdaniy KMK Publ., 2021. (In Russian)].
3. Gong R., Song S., Ai Y., Wang S., Dong X., Ren Z., Xie H., Jiang B., Zhao L. Exploring the growing forest musk deer (*Moschus berezovskii*) dietary protein requirement based on gut microbiome. *Front. Microbiol.* 2023;14:1124163. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1124163
4. He L., Li L.-H., Wang W.-X., Liu G., Liu H.-Q., Liu W.-H., Hu D. Welfare of farmed musk deer: Changes in the biological characteristics of musk deer in farming environments. *Applied Animal Behaviour Science*. 2014. DOI: 10.1016/j.applanim.2014.03.011
5. Hu X., Liu G., Li Y., Wei Y., Lin S., Liu S., Zheng Y., Hu D. High-throughput analysis reveals seasonal variation of the gut microbiota composition within forest musk deer (*Moschus berezovskii*). *Front. Microbiol.* 2018;9:1674. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01674
6. Zhao G., Ma T., Tang W., Li D., Mishra S.K., Xu Z., Wang Q., Jie H. Gut microbiome of chinese forest musk deer examined across gender and age. *Biomed. Res. Int.* 2019;2019:9291216. DOI: 10.1155/2019/9291216

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Зубалий Анастасия Михайловна*, к.б.н., доц., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: amzubaliy@gmail.com

Anastasiia M. Zubalii*, Cand. Sci. (Biol.), Assoc. Prof., Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: amzubaliy@gmail.com

Гусева Мария Михайловна, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: borisova_mm@mail.ru

Mariya M. Guseva, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: borisova_mm@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

ИММУНИЗАЦИЯ ЯГНЯТ РЕКОМБИНАНТНЫМ МИОСТАТИНОМ ВЛИЯЕТ НА ПОКАЗАТЕЛИ РОСТА

О.Б. Жукова, Е.М. Колоскова*

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

Иммунобиотехнологические методы повышения мясной продуктивности сельскохозяйственных животных могут оказаться востребованными для эффективного животноводства. В настоящее время для иммунизации в качестве антигенов всё чаще используют рекомбинантные белки и пептиды. Ранее нами был получен штамм-продуцент рекомбинантного миостатина (рМСТ). Белок был наработан, очищен в денатурирующих условиях и в композиции с гелем гидроксида алюминия рМСТ использован в качестве вакцины для иммунизации 4-месячных ягнят. Исследовали влияние способа введения вакцины на прирост живой массы ягнят. Было показано, что однократная подкожная многоточечная иммунизация 4-месячных ягнят рМСТ в дозировке 1 мг/гол. с гелем гидроксида алюминия в качестве адьюванта эффективнее внутримышечной вакцинации стимулировала прирост живой массы.

Ключевые слова: рекомбинантный миостатин, иммунизация, ягнята, прирост живой массы

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: работа выполнена в рамках государственного задания № 0445-2021-0002.

Для цитирования: Жукова О.Б., Колоскова Е.М. Иммунизация ягнят рекомбинантным миостатином влияет на показатели роста. *Биомедицина*. 2024;20(3E):54–58. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-54-58>

Поступила 10.04.2024

Принята после доработки 03.06.2024

Опубликована 01.11.2024

IMMUNIZATION OF LAMBS WITH RECOMBINANT MYOSTATIN AFFECTS GROWTH RATES

Olga B. Zhukova, Elena M. Koloskova*

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

Immuno-biotechnological methods for increasing the meat productivity of farm animals may be in demand for effective animal husbandry. Currently, recombinant proteins and peptides are increasingly used as antigens for immunization purposes. Previously, we obtained a strain-producer of recombinant myostatin. The protein was developed, purified under denaturing conditions and, in a composition with aluminum hydroxide gel, rMST was used as a vaccine for immunization of four-month-old lambs. The effect of the vaccine administration method on the live weight gain of lambs was investigated. It was shown that one-time subcutaneous multipoint immunization of four-month-old lambs with rMST at a dosage of 1 mg/head

in aluminum hydroxide gel as an adjuvant was more effective than intramuscular vaccination in stimulating body weight gain.

Keywords: recombinant myostatin, immunization, lambs, live weight gain

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

Funding: the work was performed in the framework of State Project No. 0445-2021-0002.

For citation: Zhukova O.B., Koloskova E.M. Immunization of Lambs with Recombinant Myostatin Affects Growth Rates. *Journal Biomed.* 2024;20(3E):54–58. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-54-58>

Submitted 10.04.2024

Revised 03.06.2024

Published 01.11.2024

Введение

Белок миостатин (МСТ), продукт экспрессии гена *MSTN*, является одним из отрицательных регуляторов роста скелетных мышц: ингибирует синтез белков в мышцах, дифференцировку и пролиферацию миоцитов [3]. В настоящее время активно разрабатываются способы блокирования активности МСТ на разных уровнях [6], один из которых — системное введение антител против него. С другой стороны, оценивается возможность использования рекомбинантного МСТ (рМСТ) для индуцирования синтеза специфических антител (аутоантител) против эндогенного белка [8].

Аминокислотная последовательность МСТ идентична у многих видов животных. Рекомбинантный МСТ как иммуноген в составе вакцин может быть использован для повышения мясной продуктивности сельскохозяйственных животных (крупный и мелкий рогатый скот, свиньи, лошади, кролики), птицы.

Эффективные, безопасные и недорогие блокаторы действия МСТ могли бы быть востребованы в мясном животноводстве. В научно-исследовательских экспериментах свою эффективность показали рекомбинантный рецептор ACVR2B, являющийся рецептором к МСТ [4], рекомбинантные нанотела к МСТ [7]. Более дешёвый и привлекательный вариант — рМСТ в качестве вакцины для образования антител к нему самим организмом [9].

Ранее нами был создан штамм-продуцент *E. coli* /*pET-MSTN* с высоким уровнем экспрессии рМСТ, показана иммуногенность белка при иммунизации им кроликов и овец [1, 2].

Целью исследования была оценка влияния способа вакцинации рМСТ на привесы молодняка овец.

Материалы и методы

Вакцина. рМСТ в буфере с 8 М мочевиной (5 мг/мл) разводили стерильным физ. р-ром до концентрации 2 мг/мл и смешивали с адьювантом — гелем гидроокиси алюминия (Щёлковский биокомбинат, Россия) — в объёмном соотношении 1:1. Доза вводимого препарата составляла 1 мг рМСТ/гол.

Опытные животные. В эксперименте использовали ягнят (баранчики) мериносовой породы в возрасте 4 мес. Были сформированы три группы: контрольная (К — не иммунизировали) и две опытных группы по 8 гол. в каждой, по принципу парных аналогов. Всех животных перед началом эксперимента маркировали с помощью ушных бирок с нанесённым соответствующим номером. Эксперимент проводили в зимний период. Животные содержались в производственном помещении (загон-ферма) частного овцеводческого комплекса (Московская обл.). Кормление осуществлялось по технологической схеме хозяйства,

на основном рационе для овец. Вода была в свободном доступе.

Способ иммунизации. Вакцину вводили внутримышечно животным первой опытной группы (ВМ — внутримышечное введение, одноточечно в область холки), подкожно животным второй опытной группы (ПК, 3–4 точки в подмышечную область, лишённую плотного шёрстного покрова).

Взвешивание ягнят проводили перед введением вакцины, и далее через 14 и 28 сут после вакцинации.

Статистическую обработку результатов выполняли с использованием пакета статистического анализа данных программы Microsoft Office Excel 2010. Достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

В предыдущих наших исследованиях в экспериментах на кроликах и овцах было показано, что рМСТ обладает достаточной иммуногенностью и индуцирует синтез специфических аутоантител к миостатину. При иммунизации кроликов калифорнийской породы рМСТ мы наблюдали прирост массы тела и среднесуточный прирост выше, чем у животных контрольной группы [1, 2]. Кроме того, по использованной в настоящей работе схеме нами были иммунизированы баранчики 6-месячного возраста. В результате однократная внутримышечная одноточечная вакцинация оказалась неэффективной, но при подкожной вакцинации

средний привес за 28 сут эксперимента у баранчиков опытной группы был достоверно выше по сравнению с животными контрольной группы (неопубликованные данные).

В другом эксперименте, при иммунизации мышей в возрасте 2 и 4 недели этой же вакциной, была показана зависимость прироста живой массы от возраста: более молодые мышата росли быстрее (неопубликованные данные). Это наблюдение легло в основу проведения эксперимента на 4-месячных ягнятах. Результаты взвешивания баранчиков представлены в таблице.

Из полученных результатов следует, что при внутримышечном введении вакцины у баранчиков средний привес за 28 сут после иммунизации был выше, чем у неиммунизированных ягнят. Подкожная вакцинация привела к достоверно более высокому приросту живой массы уже на 14-е сут после вакцинации.

Заключение

Однократная иммунизация 4-месячных ягнят рМСТ в дозировке 1 мг/гол. с гелем гидроксида алюминия в качестве адьюванта оказалась достаточно эффективной при подкожной многоточечной иммунизации: привесы ягнят уже через две недели после иммунизации были достоверно выше, чем у контрольных животных, что совпало с классическим профилем образования антительного ответа на введение антигена. Даже при внутримышечном способе вакцинации

Таблица. Динамика массы тела ягнят опытных групп при разных вариантах иммунизации ($M \pm m$, $n=8$)
Table. Dynamics of lamb body weight in experimental groups with different immunization options ($M \pm m$, $n=8$)

Масса животных, кг	Группы		
	К	ВМ	ПК
Начало опыта, кг	34,7±1,06	33,4±1,56	34,8± 1,22
Через 14 сут, кг	36,8±1,06	35,7±1,60	37,7±1,21
Через 28 сут, кг	38,5±1,32	37,7±1,77	40,0±1,34
Средний привес за 14 сут, кг	2,1±0,33	2,3±0,19	3,0±0,38*
Средний привес за 28 сут, кг	3,8±0,54	4,3±0,47	5,3±0,30*

Примечание: * — $p < 0,05$ относительно контрольной группы.

Note: * — $p < 0,05$ relative to the control group.

у 4-месячных ягнят наблюдали тенденцию к повышению скорости привесов по сравнению с неиммунизированными животными.

Несмотря на полученные результаты, остаётся ряд вопросов и предположений, которые необходимо решить в дальнейшей работе в разрабатываемом направлении иммунобиотехнологического способа повышения продуктивности сельскохозяйственных животных. Самые очевидные из них:

– В каком возрасте нужно делать первую иммунизацию животных для достижения максимального эффекта?

– Как часто необходимо иммунизировать животных рМСТ для достижения максимального эффекта?

– Не приведёт ли блокировка эндогенного миостатина аутоантителами к повышению уровня экспрессии с целью компенсации естественного уровня этого миокина?

Ответы на эти вопросы позволят нам разрабатывать приемлемые в широком практическом диапазоне иммунобиотехнологические методы повышения мясной продуктивности сельскохозяйственных животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Колоскова Е.М., Езерский В.А., Жукова О.Б. Получение бактериального рекомбинантного миостатина для индуцирования синтеза специфических к миостатину аутоантител. *Биомедицина*. 2022;18(3):22–26. [Koloskova E.M., Ezerskiy V.A., Zhukova O.B. Poluchenie bakterial'nogo rekombinantnogo miostatina dlya indutsirovaniya sinteza spetsificheskikh k miostatinu autoantitel [Preparation of bacterial recombinant myostatin to induce the synthesis of myostatin-specific autoantibodies]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2022;18(3):22–26. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-18-3-22-26
2. Колоскова Е.М., Езерский В.А. Рекомбинантный миостатин: выделение и использование в вакцинах. *Биомедицина*. 2023;19(3):17–22. [Koloskova E.M., Ezerskiy V.A. Rekombinantnyy miostatin: vydelenie i ispol'zovanie v vaktsinakh [Recombinant myostatin: Isolation and use in vaccines]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2023;19(3):17–22. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-19-3-17-22
3. Chen J., Wang M., Kong Y., Ma H., Zou S. Comparison of the novel compounds creatine and pyruvate on lipid and protein metabolism in broiler chickens. *Animal*. 2011;5(7):1082–1089. DOI: 10.1017/S1751731111000085
4. Lee S.J., Reed L.A., Davies M.V., Girgenrath S., Goad M.E., Tomkinson K.N., Wright J.F., Barker C., Ehrmantraut G., Holmstrom J., Trowell B., Gertz B., Jiang M.S., Sebold S.M., Matzuk M., Li E., Liang L.F., Quattlebaum E., Stotish R.L., Wolfman N.M. Regulation of muscle growth by multiple ligands signaling through activin type II receptors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2005;102(50):18117–18122. DOI: 10.1073/pnas.0505996102
5. Matsiela M.S., Naicker L., Khoza T., Mokoena N. Safety and immunogenicity of inactivated Rift Valley Fever Smithburn viral vaccine in sheep. *Viol. J*. 2023;20(1):221. DOI: 10.1186/s12985-023-02180-2
6. Nielsen T.L., Vissing J., Krag T.O. Antimyostatin treatment in health and disease: The story of great expectations and limited success. *Cells*. 2021;10(3):533. DOI: 10.3390/cells10030533
7. Ou K., Li Y., Wu P., Guo J., Hao X., Sheng J., Chen C.A. Novel nanobody directed against ovine myostatin to enhance muscle growth in mouse. *Animals (Basel)*. 2020;10(8):1398. DOI: 10.3390/ani10081398
8. Xu Y., Mao L., Zheng Y. Prokaryotic expression and immunogenicity analysis of yak recombinant myostatin. *Anim. Biotechnol*. 2012;23(4):253–260. DOI: 10.1080/10495398.2012.722157
9. Zhang T., Yang H., Wang R., Xu K., Xin Y., Ren G., Zhou G., Zhang C., Wang L., Zhang Z. Oral administration of myostatin-specific whole recombinant yeast *Saccharomyces cerevisiae* vaccine increases body weight and muscle composition in mice. *Vaccine*. 2011;29(46):8412–8416. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.08.007

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Жукова Ольга Борисовна, Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания животных — филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста»;
e-mail: olgazhukova19801031@gmail.ru

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

Колоскова Елена Михайловна*, к.б.н., Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания животных — филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста»;

e-mail: heleko3@yandex.ru

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

e-mail: heleko3@yandex.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

СОЗДАНИЕ СИНЕРГИЧЕСКОГО СИНБИОТИКА НА ОСНОВЕ КОНСОРЦИУМА ШТАММОВ ЛАКТОБАЦИЛЛ *LIMOSILACTOBACILLUS FERMENTUM* 3872, *LIGILACTOBACILLUS SALIVARIUS* 7247 И ПРЕБИОТИКА АКТИГЕН ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ САЛЬМОНЕЛЛЁЗА У ЧЕЛОВЕКА И СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

А.М. Маноян^{1,*}, А.В. Мачулин², Т.Т. Папазян³, О.Е. Иванова¹, А.Н. Панин¹

¹ ФГБУ «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации
лекарственных средств для животных и кормов»
123022, Российская Федерация, Москва, Звенигородское ш., 5

² Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина,
ФГБУН ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований» РАН
142290, Российская Федерация, Московская обл., Пушкино, просп. Науки, 5

³ ООО «Оллтек»
105062, Российская Федерация, Москва, Подсосенский пер., 26, стр. 3

Salmonella enteritidis (SE) относится к нозокомиальным инфекциям, колонизирует кишечник кур и свиней, что приводит к загрязнению пищевых продуктов и увеличивает риск передачи возбудителя человеку по пищевой цепочке. Штаммы SE с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) особенно опасны для новорождённых детей и молодняка сельскохозяйственных животных. Разработка и практическое использование синергических синбиотиков является новым профилактическим направлением, ограничивающим распространение сальмонеллёзной инфекции. В составе синергического синбиотика сочетаются пробиотики и пребиотики, которые функционируют оптимально. Роль синбиотиков в профилактике SE не изучена. Целью исследования явилось создание синергического синбиотика, обладающего бактерицидной активностью и антиадгезивными свойствами в отношении сальмонелл. В результате проведённых исследований создан инновационный синергический синбиотик, в состав которого входит консорциум пробиотических штаммов лактобацилл *L. fermentum* 3872 и *L. salivarius* 7247, а также пребиотик Актиген, представляющий собой фрагмент клеточной стенки *S. cerevisiae*. В опытах *in vitro* впервые установлено, что консорциум обладает выраженным бактерицидным действием на МЛУ SE. Культуральная жидкость консорциума совместно с пребиотиком Актиген проявляет синергизм антиадгезивной активности в отношении МЛУ SE. Полученные результаты будут использованы для разработки протокола доклинических испытаний эффективности создаваемого синбиотика в опытах *in vivo* на экспериментальных животных.

Ключевые слова: пробиотики, пребиотики, синбиотики, *Salmonella*, адгезия

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Маноян А.М., Мачулин А.В., Папазян Т.Т., Иванова О.Е., Панин А.Н. Создание синергического синбиотика на основе консорциума штаммов лактобацилл *Limosilactobacillus fermentum* 3872, *Ligilactobacillus salivarius* 7247 и пребиотика Актиген для профилактики сальмонеллёза у человека и сельскохозяйственных животных. *Биомедицина*. 2024;20(3E):59–64. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-59-64>

Поступила 10.04.2024

Принята после доработки 22.05.2024

Опубликована 01.11.2024

CREATION OF A SYNERGISTIC SYMBIOTIC BASED ON THE CONSORTIUM OF LACTOBACILLI *LIMOSILACTOBACILLUS FERMENTUM* 3872, *LIGILACTOBACILLUS SALIVARIUS* 7247, AND THE ACTIGEN PREBIOTIC FOR SALMONELLOSIS PREVENTION IN HUMANS AND FARM ANIMALS

Ashot M. Manoyan^{1,*}, Andrey V. Machulin², Tigran T. Papazyan³, Olga E. Ivanova¹,
Alexander N. Panin¹

¹ All-Russian State Center for Animal Feed and Drug Standardization and Quality
123022, Russian Federation, Moscow, Zvenigorodskoe Highway, 5

² Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms of the Pushchino Scientific Center
for Biological Research of the Russian Academy of Sciences
142290, Russian Federation, Moscow Region, Pushchino, Nauki Ave., 5

³ ООО "Alltech"
105062, Russian Federation, Moscow, Podсосensky Lane, 26, Building 3

Salmonella enteritidis (SE), referred to as nosocomial infections, colonizes the intestines of chickens and pigs. This leads to food contamination and increased risk of pathogen transmission to humans along the food chain. Multidrug-resistant (MDR) SE strains are particularly dangerous for newborn children and young farm animals. The antibiotics traditionally used for the treatment of salmonellosis disturb the balance of the intestinal microbiota. The development and use of synergistic synbiotics is a promising preventive direction in limiting the spread of salmonella infection. Synergistic synbiotics combine prebiotics and probiotics, which thus function optimally. The role of synbiotics in the prevention of SE remains to be elucidated. The aim of this study was to create a synergistic synbiotic with bactericidal activity and anti-adhesive properties against salmonella. As a result of the conducted research, an innovative synergistic synbiotic was created. This preparation comprises a consortium of probiotic strains of lactobacilli *L. fermentum* 3872 + *L. salivarius* 7247 and the Actigen prebiotic (a fragment of the cell wall of *S. cerevisiae*). *In vitro* experiments revealed that the consortium has a pronounced bactericidal effect on MDR SE. The culture fluid of the consortium, together with the Actigen prebiotic, is active and exhibits synergistic anti-adhesive properties against MDR SE. Further studies will apply the results obtained for developing a protocol for preclinical studies of the created synbiotic *in vivo* on experimental animals.

Keywords: probiotics, prebiotics, synbiotics, *Salmonella*, adhesion

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

For citation: Manoyan A.M., Machulin A.V., Papazyan T.T., Ivanova O.E., Panin A.N. Creation of a Synergistic Symbiotic Based on the Consortium of Lactobacilli *Limosilactobacillus fermentum* 3872, *Ligilactobacillus salivarius* 7247, and the Actigen Prebiotic for Salmonellosis Prevention in Humans and Farm Animals. *Journal Biomed.* 2024;20(3E):59–64. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-59-64>

Submitted 10.04.2024

Revised 22.05.2024

Published 01.11.2024

Введение

Salmonella enterica — вид грамотрицательных бактерий, содержащий более 2600 различных сероваров, дифференцированных по антигенной презентации [3]. Серовары *S. enteritidis* (SE) и *S. typhimurium* (ST) являются наиболее распространёнными патогенами пищевого происхождения и считаются социально значимыми зооантропонозными инфекциями [1]. Сальмонеллёз, вызываемый сероварами SE и ST, относят к ведущим бактериальным инфекциям в мире [8], от которых страдают более 93 млн людей ежегодно [7]. К концу 20-го века SE занял экологическую нишу, в которой ранее обитал *S. enterica* серовар *Gallinarum* у домашней птицы. Это привело к существенному увеличению в мире числа крупных вспышек сальмонеллёза, а также к росту смертности у домашней птицы и людей [6]. SE относится к нозокомиальным инфекциям. У цыплят-бройлеров и новорождённых детей в возрасте 2–6 недель SE вызывает некротизирующий энтероколит [4].

Традиционно в качестве стратегии борьбы с сальмонеллёзными инфекциями используются антибиотики. Однако применение антибиотиков не только способствовало развитию множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) к антибиотикам среди сероваров сальмонелл, но и нарушало баланс нормальной кишечной микробиоты [5]. Новой альтернативой антибиотикам являются синергические синбиотики, однако их роль в профилактике сальмонеллёза не изучена.

Целью исследования явилось создание синергического синбиотика, обладающего бактерицидной активностью и антиадгезивными свойствами, для профилактики сальмонеллёза у человека и сельскохозяйственных животных.

Материалы и методы

Антагонистическую активность консорциума штаммов лактобацилл *Limosilacto-*

bacillus fermentum 3872 (LF3872) + *Ligilactobacillus salivarius* 7247 (LS7247) в отношении SE патогена определяли методом совместного культивирования [2]. Для изучения способности синбиотика ингибировать адгезию SE к энтероцитам использовали иммортализованную линию эпителиальных клеток Caco-2 тонкого кишечника человека в качестве модельной системы *in vitro*.

Результаты и их обсуждение

Бактерицидная активность консорциума штаммов лактобацилл (LF3872 + LS7247)

Результаты совместного культивирования SE с консорциумом штаммов лактобацилл (LF3872 + LS7247) и отдельными штаммами, входящими в его состав, показаны на рисунке. При совместном культивировании SE с консорциумом лактобацилл в течение 4 ч количество живых клеток патогена снизилось с 3,0 до $2,4 \pm 0,2$ log КОЕ/мл. Общее количество живых клеток консорциума лактобацилл в течение 4-часового совместного культивирования с SE увеличилось

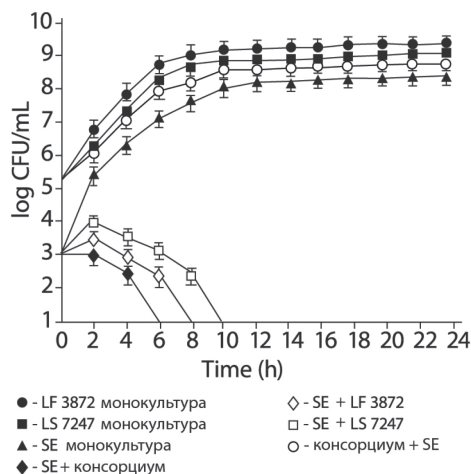


Рис. Бактерицидное действие консорциума штаммов лактобацилл (LF3872 + LS7247) к SE патогену.

Fig. Bactericidal effect of a consortium of lactobacilli strains (LF3872 + LS7247) against the SE pathogen.

Таблица. Синергизм действия ЛКЖ консорциума штаммов лактобацилл (LF3872+ LS7247) и пребиотика Актиген в ингибировании адгезии МЛЮ SE к Сасо-2 энтероцитам

Table. Synergism of the action of LCL of consortium of lactobacilli strains (LF3872+ LS7247) and the prebiotic Actigen in inhibiting the adhesion of MDR SE to Caco-2 enterocytes

Тест-культура, штамм	ЗФР, Контроль	ЛКЖ ¹	Актиген ²	ЛКЖ + Актиген ³
<i>S. enteritidis</i> ATCC 13076	31,4±1,6	6,2±0,7**	4,8±0,5**	0,54±0,03***
<i>S. enteritidis</i> ATCC 4931	33,5±1,8	7,5±0,9**	5,3±0,6**	0,69±0,04***
<i>S. enteritidis</i> IIE Egg 6215	30,7±1,3	6,4±0,5**	5,7±0,4**	0,81±0,05***
<i>S. enteritidis</i> IIE Egg 6218	32,5±1,7	6,9±0,7**	4,6±0,5**	0,57±0,03***
<i>S. enteritidis</i> IIE Egg 6219	34,3±1,9	6,8±0,4**	5,9±0,8**	0,62±0,05***
<i>S. enteritidis</i> IIE Egg 6235	30,8±1,4	7,3±1,0**	6,1±0,4**	0,58±0,04***

Примечание: контроль — штаммы SE, предварительно инкубированные в ЗФР (забуференном физ. р-ре). ¹ — лиофилизированная культуральная жидкость (ЛКЖ) консорциума штаммов (LF3872 + LS7247) (40 мкг/мл); ² — пребиотик Актиген (40 мкг/мл); ³ — смесь ЛКЖ (лиофилизированной культуральной жидкости) (20 мкг/мл) и пребиотика (20 мкг/мл). ** — снижение адгезии на Сасо-2 энтероцитах штаммов SE, предварительно инкубированных с ЛКЖ (40 мкг/мл), а также предварительно инкубированных с пребиотиком Актиген (40 мкг/мл), по отношению к контролю ($p<0,01$); *** — снижение адгезии на Сасо-2 энтероцитах штаммов SE, предварительно инкубированных со смесью, содержащей ЛКЖ консорциума штаммов (20 мкг/мл) и пребиотик Актиген (20 мкг/мл), по отношению к контролю ($p<0,001$).

Note: контроль — SE strains pre-incubated in physiologic buffered saline. ¹ — lyophilized culture fluid (LCF) of the strain consortium (LF3872 + LS7247) (40 µg/ml); ² — prebiotic Actigen (40 µg/ml); ³ — mixture of LCF (20 µg/ml) and prebiotic (20 µg/ml). ** — decreased adhesion to Caco-2 enterocytes of SE strains pre-incubated with LCF (40 µg/ml), as well as pre-incubated with prebiotic Actigen (40 µg/ml), relative to the control ($p<0.01$); *** — decreased adhesion to Caco-2 enterocytes of SE strains pre-incubated with a mixture containing the LCL of the consortium of strains (20 µg/ml) and the prebiotic Actigen (20 µg/ml), relative to the control ($p<0.001$).

с 5,4 до 7,2±0,2 log КОЕ/мл. Через 6 ч совместного культивирования с SE количество живых клеток консорциума лактобацилл увеличилось до 7,9±0,2 log КОЕ/мл. Число живых SE, при совместном культивировании с консорциумом лактобацилл в течение 6 ч, резко сократилось (<10 КОЕ/мл), в то время как в монокультуре число живых SE клеток выросло до 6,8±0,4 log КОЕ/мл. Подобное ингибирование роста SE клеток наблюдалось при совместном культивировании со штаммом лактобацилл LF3872 через 8 ч и при совместном культивировании патогена со штаммом лактобацилл LS7247 через 10 ч. Таким образом, консорциумом штаммов лактобацилл (LF3872 + LS7247) обладает высокой бактерицидной активностью к МЛЮ SE.

Синергизм антиадгезивных свойств пребиотика Актиген и КЖ консорциума (LF3872 + LS7247)

Лиюфилизированная культуральная жидкость (ЛКЖ) консорциума штаммов лак-

тобацилл (LF3872 + LS7247) и пребиотик Актиген проявляли синергизм в ингибировании адгезии МЛЮ SE к Сасо-2 энтероцитам (табл.). Таким образом, создаваемый препарат относится к синергическим синбиотикам.

Выводы

Консорциум пробиотических штаммов лактобацилл (LF3872 + LS7247) обладает высокой антагонистической активностью к МЛЮ SE. Смесь КЖ консорциума штаммов лактобацилл и пребиотика Актиген проявляет синергизм антиадгезивных свойств в отношении МЛЮ SE. Исследования *in vitro* показали, что на основе консорциума штаммов (LF3872 + LS7247) и пребиотика Актиген целесообразно создание инновационного синергического синбиотика для человека и кормовой добавки для сельскохозяйственных животных с целью профилактики кишечных заболеваний, вызываемых МЛЮ SE.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Ceysens P.-J., Mattheus W., Vanhoof R., Bertrand S. Trends in serotype distribution and antimicrobial susceptibility in *Salmonella enterica* isolates from humans in Belgium, 2009 to 2013. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015;59(1):544–552. DOI: 10.1128/AAC.04203-14
2. Coman M.M., Verdenelli M.C., Cecchini C., Silvi S., Orpianesi C., Boyko N., Cresci A. In vitro evaluation of antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501®, *Lactobacillus paracasei* IMC 502® and SYN BIO® against pathogens. *J. Appl. Microbiol.* 2014;117(2):518–527. DOI: 10.1111/jam.12544
3. Gal-Mor O., Boyle E.C., Grassl G.A. Same species, different diseases: How and why typhoidal and non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars differ. *Front. Microbiol.* 2014;5:391. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00391
4. Hackam D.J., Sodhi C.P., Good M. New insights into necrotizing enterocolitis: From laboratory observation to personalized prevention and treatment. *J. Pediatr. Surg.* 2019;54(3):398–404. DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2018.06.012
5. Hammad A.M., Shimamoto T. Towards a compatible probiotic-antibiotic combination therapy: Assessment of antimicrobial resistance in the Japanese probiotics. *J. Appl. Microbiol.* 2010;109(4):1349–1360. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2010.04762.x
6. Rabsch W., Hargis B.M., Tsolis R.M., Kingsley R.A., Hinz K.H., Tschäpe H., Bäuml A.J. Competitive exclusion of *Salmonella enteritidis* by *Salmonella gallinarum* in poultry. *Emerg. Infect. Dis.* 2000;6:443–448. DOI: 10.3201/eid0605.000501
7. Torgerson P.R., Devleeschauwer B., Praet N., Speybroeck N., Willingham A.L., Kasuga F., Rokni M.B., Zhou X.N., Fèvre E.M., Sripa B., Gargouri N., Fürst T., Budke C.M., Carabin H., Kirk M.D., Angulo F.J., Havelaar A., de Silva N. World Health Organization estimates of the global and regional disease burden of 11 foodborne parasitic diseases, 2010: A data synthesis. *PLoS Med.* 2015;12(12):e1001920. DOI: 10.1371/journal.pmed.1001920
8. Verbrugghe E., Dhaenens M., Leyman B., Boyen F., Shearer N., Van Parys A., Haesendonck R., Bert W., Favoreel H., Deforce D., Thompson A., Haesebrouck F., Pasmans F. Host stress drives *Salmonella* recrudescence. *Sci. Rep.* 2016;6:20849. DOI: 10.1038/srep20849

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Маноян Ашот Месропович*, ФГБУ «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов»;
e-mail: a.manoyan@vgnki.ru

Мачулин Андрей Валериевич, к.б.н., Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина, ФГБУН ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований» РАН;
e-mail: and.machul@gmail.com

Папазян Тигран Тагворович, к.в.н., ООО «Оллтек»;
e-mail: tpapazyan@alltech.com

Иванова Ольга Евгеньевна, к.б.н., ФГБУ «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов»;
e-mail: o.ivanova@vgnki.ru

Ashot M. Manoyan*, All-Russian State Center for Animal Feed and Drug Standardization and Quality;
e-mail: a.manoyan@vgnki.ru

Andrey V. Machulin, Cand. Sci. (Biol.), Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms of the Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: and.machul@gmail.com

Tigran T. Papazyan, Cand. Sci. (Vet.), Alltech;
e-mail: tpapazyan@alltech.com

Olga E. Ivanova, Cand. Sci. (Biol.), All-Russian State Center for Animal Feed and Drug Standardization and Quality;
e-mail: o.ivanova@vgnki.ru

Панин Александр Николаевич, акад. РАН,
д.в.н., проф., ФГБУ «Всероссийский государст-
венный Центр качества и стандартизации лекар-
ственных средств для животных и кормов»;
e-mail: a.panin@vgnki.ru

Alexander N. Panin, Acad. of the Russian Academy
of Sciences, Dr. Sci. (Vet.), Prof., All-Russian State
Center for Animal Feed and Drug Standardization
and Quality;
e-mail: a.panin@vgnki.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ ДЛЯ СКРИНИНГА МЕДИКАМЕНТОЗНЫХ СРЕДСТВ ПЕРВОЙ ПОМОЩИ ПРИ СУДОРОЖНОМ СИНДРОМЕ НЕУСТАНОВЛЕННОЙ ЭТИОЛОГИИ

А.С. Мелехова*, Ю.Ю. Ивницкий, К.А. Краснов, А.В. Бельская

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

Разработаны три экспериментальные модели, пригодные для скрининга медикаментозных средств первой помощи при судорогах неустановленной этиологии. В качестве судорожных воздействий предложены подъём крыс в барокамере на «высоту» 12 км, внутрибрюшинное введение им 50% р-ра камфоры в N-метилпирролидоне в объёме 2 мл/кг или ацетата аммония в дозе 770 мг/кг в водном р-ре. В качестве необходимых и достаточных критериев оценки эффективности тестируемых препаратов предложены латентное время судорог и летальность. Разработанные модели позволяют оценивать эффективность потенциальных антиконвульсантов в режиме экстренной профилактики или купирования судорог. В силу универсальности механизмов нейротоксичности применённых судорожных агентов данные экспериментальные модели пригодны для идентификации антиконвульсантов, эффективных при судорожном синдроме неустановленной этиологии.

Ключевые слова: аммония ацетат, гипобарическая гипоксия, камфора, первая помощь, судорожный синдром, экспериментальные модели

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Мелехова А.С., Ивницкий Ю.Ю., Краснов К.А., Бельская А.В. Экспериментальные модели для скрининга медикаментозных средств первой помощи при судорожном синдроме неустановленной этиологии. *Биомедицина*. 2024;20(3E):65–69. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-65-69>

Поступила 04.04.2024

Принята после доработки 21.05.2024

Опубликована 01.11.2024

EXPERIMENTAL MODELS FOR SCREENING FIRST AID MEDICATIONS FOR CONVULSIVE SYNDROME OF OBSCURE ETIOLOGY

Alexandra S. Melekhova*, Yury Yu. Ivnitsky, Konstantin A. Krasnov, Alisa V. Belskaya

Golikov Research Clinical Center of Toxicology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia
192019, Russian Federation, Saint Petersburg, Bekhtereva Str., 1

Three experimental models suitable for screening first aid medications for seizures of obscure etiology are developed. Hypobaric exposure in a pressure chamber at an “altitude” of 12 km, intraperitoneal administration of a 50% N-methylpyrrolidone solution of camphor in a volume of 2 ml/kg, or an aqueous solution of ammonium acetate in a dose of 770 mg/kg were used to induce convulsions in rats. Seizure latency time and lethality are proposed as necessary and sufficient criteria for assessing the effectiveness of tested pharmaceuticals. The developed models make it possible to evaluate the efficacy of potential anticonvulsants in the mode of emergency prevention or seizure relief. Due to the versatility of the neurotoxicity pathways

of the convulsive agents, these experimental models are suitable for identifying anticonvulsants that are effective in convulsive syndrome of obscure etiology.

Keywords: ammonium acetate, hypobaric hypoxia, camphor, first aid, convulsive syndrome, experimental models

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

For citation: Melekhova A.S., Ivnitsky Yu.Yu., Krasnov K.A., Belskaya A.V. Experimental Models for Screening First Aid Medications for Convulsive Syndrome of Obscure Etiology. *Journal Biomed.* 2024;20(3E):65–69. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-65-69>

Submitted 04.04.2024

Revised 21.05.2024

Published 01.11.2024

Введение

Стремительность развития судорожного синдрома (СС) при травмах и острых отравлениях определяет потребность в антиконвульсантах, применяемых до вмешательства медицинского персонала. В перечне мероприятий первой помощи, предписанных Приказом Минздравсоцразвития РФ № 477н от 04.05.2012 г., устранение СС не значится ввиду отсутствия таких препаратов. Они должны быть эффективными безотносительно природы конвульсанта, устранять судороги при введении как до, так и после его воздействия, предотвращать гибель пострадавшего до оказания ему первой врачебной помощи. Действующие рекомендации по доклиническому исследованию антиконвульсантов нацелены на поиск антиэпилептических средств [1], назначение которых — плановая профилактика, а не купирование или экстренная профилактика судорог. Влияние таких препаратов на летальное действие модельного конвульсанта второстепенно, в то время как для средств первой помощи оно важно. Но при скрининге антиэпилептических средств используют преимущественно мышей, введение которым препаратов в объеме, биоэквивалентном таковому для человека, затруднительно. Поэтому действующие рекомендации не пригодны для скрининга средств первой помощи при СС.

Цель работы — разработка экспериментальных моделей, пригодных для скрининга медикаментозных средств первой помощи при СС неустановленной этиологии.

Материалы и методы

Использовали самцов инбредных крыс-альбиносов в возрасте 3 мес. массой 200–220 г, источник — ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово» (Ленинградская обл.), получавших корм для крыс и питьевую воду *ad libitum*.

Для моделирования острой гипобарической гипоксии крыс последовательно помещали в барокамеру емкостью 50 л «Suszarka groznowa typ SPR» (Польша) и снижали барометрическое давление до значения, отвечающего заданной «высоте» над уровнем барозала, со скоростью «подъема» 100 м/с. После начала судорог барометрическое давление нормализовали в течение 1 мин. Камфору («Ленреактив», Россия) растворяли в N-метилпирролидоне (500 г/л), вводили внутрибрюшинно (в. б.) и дозировали изменением объема. Аммоний уксуснокислый (чда) («Ленреактив», Россия) вводили в. б. в виде водного р-ра в объеме 5 мл/кг и дозировали изменением концентрации. Латентное время судорог или гибели представляли как среднее значение и его ошибку ($M \pm m$).

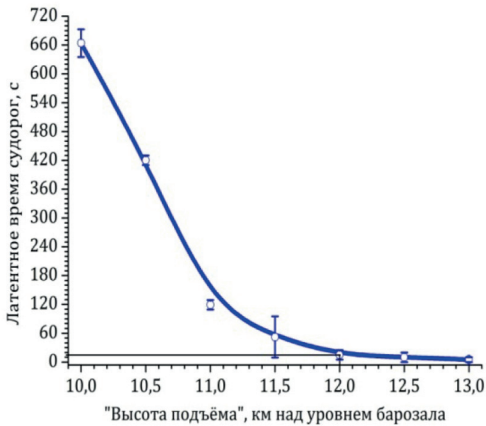


Рис. 1. Зависимость латентного времени судорог от «высоты подъёма» крыс в барокамере ($M \pm m$; $n=4$).
Fig. 1. Dependence of the latent time of seizures on the “altitude” of rats in a pressure chamber ($M \pm m$; $n=4$).

Результаты и их обсуждение

Латентное время клонико-тонических судорог с преобладанием тонического компонента сокращалось с «высотой» барокамерного «подъёма» (рис. 1).

Валидность данной модели определяется наличием СС в клинической картине острой гипобарической гипоксии [2] и гипоксии — при СС [3]. Введение антиконвульсантов перед «подъёмом» на «высоту»

12 км с измерением в качестве показателей их эффективности латентного времени судорог и выживаемости — модель экстренной профилактики СС.

Введение камфоры вело к развитию через несколько минут тремора и клонико-тонических судорог с преобладанием клонического компонента, продолжавшихся до 4 сут. При дозе 1 г/кг большинство животных погибло в течение 2 ч и почти все — в течение 4 сут (рис. 2); эта доза рекомендуется для моделирования СС. В отличие от медленно резорбирующегося масляного р-ра камфоры, рекомендованного в качестве судорожного агента [1], введение её р-ра в N-метилпирролидоне позволяло чётко регистрировать начало судорог. Камфора прямо активирует возбудимые мембраны нейронов, что обеспечивает валидность результатов тестирования потенциальных средств купирования СС неустановленной этиологии.

Введение крысам аммония ацетата вызывало через несколько минут экзотальм, атаксию и клонико-тонические судороги с периодическим опистотонусом. Летальные исходы отмечались не ранее 20 мин и не позднее суток после инъекции. При дозе 770 мг/кг, рекомендуемой

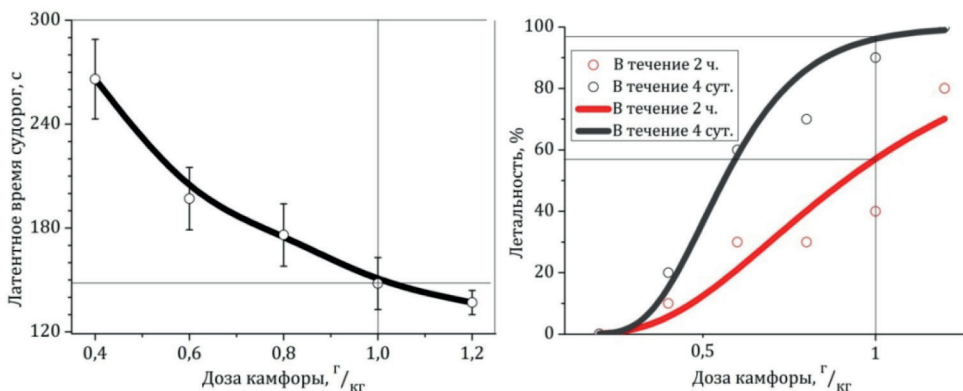


Рис. 2. Линии трендов дозовой зависимости латентного времени судорог и летальности у крыс после введения камфоры ($M \pm m$; $n=8$).
Fig. 2. Trend lines of dose dependence of seizure latency time and lethality in rats after camphor administration ($M \pm m$; $n=8$).

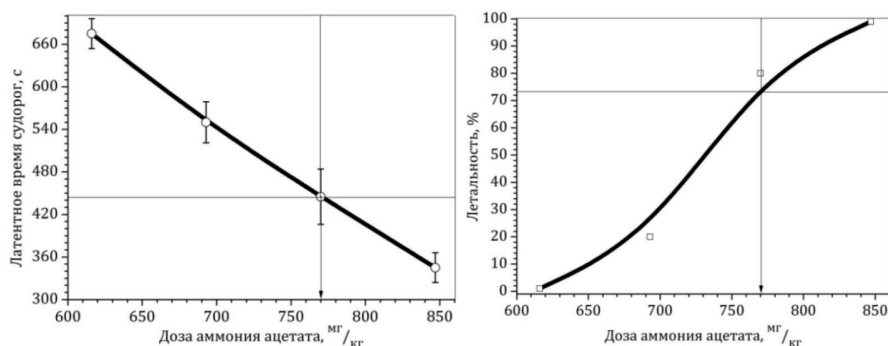


Рис. 3. Линии трендов дозовой зависимости латентного времени развития судорог и летальности у крыс после внутрибрюшинного введения аммония ацетата ($M \pm m$; $n=10$).

Fig. 3. Trend lines of dose dependence of the seizure latency time and lethality in rats after intraperitoneal administration of ammonium acetate ($M \pm m$; $n=10$).

для моделирования СС в целях скрининга антиконвульсантов, гибли более половины животных (рис. 3). Наличие не менее чем шести механизмов нейротоксичности аммиака обеспечивает валидность данной экспериментальной модели.

Закключение

Разработаны экспериментальные модели для скрининга медикаментозных средств первой помощи при судорожном синдроме неустановленной этиологии, применяемых с целью его экстренной профилактики и купирования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Воронина Т.А., Неробкова Л.Н. Методические рекомендации по доклиническому изучению противосудорожной активности лекарственных средств. В кн.: *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая*. Под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К, 2012:235–250. [Voronina T.A., Nerobkova L.N. Metodicheskie rekomendatsii po doklinicheskomu izucheniyu protivosudorozhnoy aktivnosti lekarstvennykh sredstv [Methodological recommendations for preclinical study of anticonvulsant activity of drugs]. V kn.: *Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. Chast' pervaya* [In the book: Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. Part one]. Ed. by A.N. Mironov. Moscow: Grif i K Publ., 2012:235–250. (In Russian)].
2. Li J.J., Zhang G., Wang X., Qiangba C., Song X., Lin R., Huang C., Yang X., Ning S., Zhang J., Liao H., Xie S., Suo Z., Qi H., Yu Z., Shi R., Yao Y. Characteristics of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy at high altitude and early results of therapeutic hyperthermia. *BMC Pediatr.* 2023;23(1):609. DOI: 10.1186/s12887-023-04421-3
3. Villa B.R., Bhatt D., Wolff M.D., Addo-Osafo K., Epp J.R., Teskey G.C. Repeated episodes of postictal hypoxia are a mechanism for interictal cognitive impairment. *Sci. Rep.* 2023;13(1):15474. DOI: 10.1038/s41598-023-42741-7

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Мелехова Александра Сергеевна*, ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии им. академика С.Н. Голикова ФМБА России»;
e-mail: melehovaalexandra@gmail.com

Aleksandra S. Melekhova*, Golikov Research Clinical Center of Toxicology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: melehovaalexandra@gmail.com

Ивницкий Юрий Юрьевич, д.м.н., проф.,
ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии
им. академика С.Н. Голикова ФМБА
России»;
e-mail: neugierig@mail.ru

Yury Yu. Ivnitsky, Dr. Sci. (Med.), Prof., Golikov
Research Clinical Center of Toxicology of the Fe-
deral Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: neugierig@mail.ru

Краснов Константин Андреевич, к.х.н., ФГБУ
«Научно-клинический центр токсикологии
им. академика С.Н. Голикова ФМБА России»;
e-mail: krasnov_tox@mail.ru

Konstantin A. Krasnov, Cand. Sci. (Chem.),
Golikov Research Clinical Center of Toxicology
of the Federal Medical and Biological Agency
of Russia;
e-mail: krasnov_tox@mail.ru

Бельская Алиса Владимировна, ФГБУ
«Научно-клинический центр токсикологии
им. академика С.Н. Голикова ФМБА России»;
e-mail: belskayaalisa@gmail.com

Alisa V. Belskaya, Golikov Research Clinical
Center of Toxicology of the Federal Medical
and Biological Agency of Russia;
e-mail: belskayaalisa@gmail.com

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПЕЧЕНИ И ПОЧЕК *CHINCHILLA LANIGERA* НА ФОНЕ ПРИМЕНЕНИЯ ВОДЫ, ОБОГАЩЁННОЙ МОЛЕКУЛЯРНЫМ ВОДОРОДОМ

Е.В. Панина^{1,2}, В.Н. Каркищенко¹, К.С. Остренко³, Д.В. Петров^{1,*}, А.Е. Сорочан²

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

² ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет — МСХА им. К.А. Тимирязева»
127434, Российская Федерация, Москва, ул. Тимирязевская, 49

³ Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии
и питания животных — филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства —
ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста»
249013, Российская Федерация, Калужская обл., Боровск, п. Институт

В статье представлены результаты применения в рационе малой длиннохвостой шиншиллы воды, обогащённой молекулярным водородом. Эксперимент был проведён на двух группах шиншилл — контрольной (n=10) и опытной (n=10). Долгосрочный научный опыт проводился в течение трёх лет. В начале, в середине и конце эксперимента у особей изымались печень и почки для определения токсического воздействия молекулярного водорода путём проведения морфометрии почечных капиллярных клубочков, характеристики сосудистого русла, определения площади гепатоцитов, их ядерно-цитоплазматического соотношения, а также стромального и паренхиматозного компонентов печени. Установлено, что в результате долгосрочного применения воды, обогащённой молекулярным водородом, площадь почечных клубочков животных опытной группы снизилась на 27% (p<0,01). Также наблюдалось увеличение паренхиматозного компонента печени и объёма цитоплазмы в гепатоцитах (p<0,01). Таким образом, включение в рацион животных воды, обогащённой молекулярным водородом, благоприятно влияет на состояние почечных клубочков, сосудистой системы и не оказывает токсического влияния на печень.

Ключевые слова: *Chinchilla lanigera*, водородный антиоксидант, почки, печень

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Панина Е.В., Каркищенко В.Н., Остренко К.С., Петров Д.В., Сорочан А.Е. Морфофункциональная характеристика печени и почек *Chinchilla lanigera* на фоне применения воды, обогащённой молекулярным водородом. *Биомедицина*. 2024;20(3E):70–76. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-70-76>

Поступила 15.04.2024

Принята после доработки 13.05.2024

Опубликована 01.11.2024

MORPHOFUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF *CHINCHILLA LANIGERA* LIVER AND KIDNEYS IN THE SETTING OF HYDROGEN-RICH WATER REGIME

Elena V. Panina^{1,2}, Vladislav N. Karkischenko¹, Konstantin S. Ostrenko³,
Dmitry V. Petrov^{1,*}, Anastasia E. Sorochan²

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 Russian State Agrarian University — Moscow Timiryazev Agricultural Academy
127434, Russian Federation, Moscow, Timiryazevskaya Str., 49

³ All-Russian Research Institute of Physiology, Biochemistry and Animal Nutrition — Branch of the Federal
Scientific Center of Animal Husbandry — The All-Russian Institute of Animal Husbandry named
after Academician L.K. Ernst
249013, Russian Federation, Kaluga Region, Borovsk, Institut Village

The article presents the results of including hydrogen-rich water in the diet of *Chinchilla lanigera* (long-tailed chinchilla). The experiment was carried out on two groups of chinchillas: control (n=10) and experimental (n=10). The long-term scientific experiment covered the period of three years. At the beginning, in to determine the toxic effects of molecular hydrogen. To that end, laboratory investigations were conducted to assess the morphometry of the renal capillary glomeruli, characterizing the vascular bed, and to determine the area of hepatocytes, their nuclear-cytoplasmic ratio, as well as the stromal and parenchymal components of the liver. The long-term use of hydrogen-rich water was shown to contribute to a decrease in the area of the renal glomeruli of animals in the experimental group by 27% ($p<0.01$). In addition, an increase in the parenchymal component of the liver and the volume of cytoplasm in hepatocytes ($p<0.01$) was observed. It is concluded that the inclusion of hydrogen-rich water in the diet of animals has a beneficial effect on the condition of the renal glomeruli and vascular system and has no toxic effect on the liver.

Keywords: *Chinchilla lanigera*, hydrogen antioxidant, kidneys, liver

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

For citation: Panina E.V., Karkischenko V.N., Ostrenko K.S., Petrov D.V., Sorochan A.E. Morphofunctional Characteristics of *Chinchilla lanigera* Liver and Kidneys in the Setting of Hydrogen-Rich Water Regime. *Journal Biomed.* 2024;20(3E):70–76. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-70-76>

Submitted 15.04.2024

Revised 13.05.2024

Published 01.11.2024

Введение

Известно, что печень и почки участвуют в регуляции практически всех основных путей метаболизма. Нарушение функционирования этих органов приводит к возникновению различных заболеваний. Немаловажную роль в этом процессе играет неблагоприятное воздействие факторов внешней и внутренней среды, приводящее к острым и хроническим стрессовым состояниям, снижающим продуктивность у животных [6] и показатели здоровья у человека [1]. Многие научные труды, связанные с адаптацией к стрессовым ситуациям, приспособлением к экстремальным условиям и влиянием на здоровье человека, посвящены поиску путей снижения негативного воздействия стресса [7].

В связи с этим особое внимание уделяется исследованиям в сфере разработки эффективных препаратов, помогающих свести к минимуму отрицательные последствия стрессов. Профилактика стрессов основана на применении препаратов разных фармакологических групп, в т. ч. содержащих антиоксиданты различного происхождения и химического состава. Поэтому в медицине становится перспективным применение молекулярного водорода, обладающего рядом преимуществ, в т. ч. отсутствием побочных эффектов, антиоксидантными, противовоспалительными, противодействующими гибели клеток и стимулирующими энергетический метаболизм свойствами [2, 10]. Не нарушая физиологические процессы организма, молекулярный водород

легко диффундирует в клетки, не повреждая их основные жизненно важные элементы, и купирует избыточную свободно-радикальную активность [4, 9].

Однако, несмотря на положительный эффект биологически активных добавок, некоторые вещества, обладающие кумулятивными свойствами (например, витамины А, Е и D), при долгосрочном употреблении могут вызывать противоположное действие вплоть до интоксикации [8]. Поэтому **целью** нашей работы стало исследование воздействие воды, обогащённой молекулярным водородом, на печень и почки малой длиннохвостой шиншиллы в долгосрочном эксперименте.

Материалы и методы

Для проведения эксперимента было отобрано 20 самцов *Chinchilla lanigera* двухмесячного возраста со средней живой массой 270 г. Группы животных, участвовавших в эксперименте, формировались методом пар-аналогов по 10 особей. Сформированные группы были рассажены в индивидуальные клетки. Условия содержания животных соответствовали зоотехническим нормам: температура окружающей среды составляла 18–20°C, влажность — 30–40%. Кормление производилось гранулированным полнорационным комбикормом для шиншилл со свободным доступом к корму. Поение в обеих группах

осуществлялось автоматизированной системой. К системе поения опытной группы был подключён аппарат для генерации молекулярного водорода Lourdes HS-81. Содержание и обращение с животными в научном эксперименте соответствовали требованиям международных правил надлежащей лабораторной практики, Федерального закона «О защите животных от жестокого обращения» от 01.09.1997 г. [5]. Протокол эксперимента был одобрен биоэтической комиссией ФГБУН НЦБМТ ФМБА России.

В возрасте 36 мес. трёх средних по массе шиншилл из группы подвергали эвтаназии, извлекали почки и печень, взвешивали, готовили гистологические препараты по стандартным методикам (фиксация в 10%-ном р-ре формалина, заливка в парафин, изготовление срезов толщиной 10–15 мкм при помощи микротомы, окраска гематоксилином и эозином). Готовые препараты микроскопировались: в почках подсчитывалось количество капиллярных клубочков в 30 полях зрения от группы, диаметр капиллярного клубочка (не менее 100 измерений от группы), площадь капиллярного клубочка. В печени измерялась площадь гепатоцита (не менее 50 измерений от группы), площадь ядра клетки, объём цитоплазмы, объём ядра, ядерно-цитоплазматическое соотношение, а также соотношение стромы и паренхимы органа. Полученные данные обрабатывались статистически.

Таблица 1. Морфологические показатели печени *Chinchilla lanigera*, $M \pm m$
Table 1. Morphological parameters of the *Chinchilla lanigera* liver; $M \pm m$

Группа	Показатель						
	Масса		Площадь, мкм ²		Объём, мкм ³		ЯЦС
	г	%	клетки	ядро	цитоплазма	ядро	
Контрольная	12,9±0,25	2,7±0,19	154±7,3	26±0,3	1525±101,8	97±1,6	0,065±0,003
Опытная	12,7±1,20	2,7±0,23	177±4,7*	27±1,3	1886±81,4**	110±8,7	0,061±0,007

Примечание: * — разница между группами достоверна при $p < 0,05$; ** — разница между группами достоверна при $p < 0,01$; ЯЦС — ядерно-цитоплазматическое соотношение.

Note: * — difference between the groups is significant at $p < 0,05$; ** — difference between the groups is significant at $p < 0,01$; ЯЦС — nuclear-cytoplasmic ratio.

Результаты и их обсуждение

В возрасте 36 мес. у самцов контрольной группы живая масса при взвешивании составила 462 г, а в опытной — 527 г, что достоверно выше на 12% ($p<0,05$). Абсолютная и относительная масса печени в обеих группах различалась незначительно (табл. 1). Площадь гепатоцитов печени животных опытной группы была достоверно больше ($p<0,05$), чем в контрольной, на 13% (рис. 1). Объём цитоплазмы клеток также был выше на 19% ($p<0,01$), ядра — на 12% (но недостоверно). Ядерно-цитоплазматическое соотношения (ЯЦС) гепатоцитов печени особей контрольной группы было несколько выше за счёт меньшего объёма ядра и цитоплазмы.

Содержание стромы в печени контрольной группы составило 18,3%, а паренхимы — 81,8%, тогда как в опытной группе этот показатель был в пределах 17,3% стромы и 82,8% паренхимы соответственно.

При изучении морфометрических показателей почек выявлено, что абсолютная масса органов в исследуемых группах в среднем составляла 3,2–3,3 г, а относительная — 0,6–0,7% (табл. 2). Структура почек представлена корковым и мозговым веществом. Кортиковые и мозговые части нечётко разграничены между собой. В структуре корковой части на протяжении всего среза визуализируются почечные канальцы, которые образуют почечный ла-

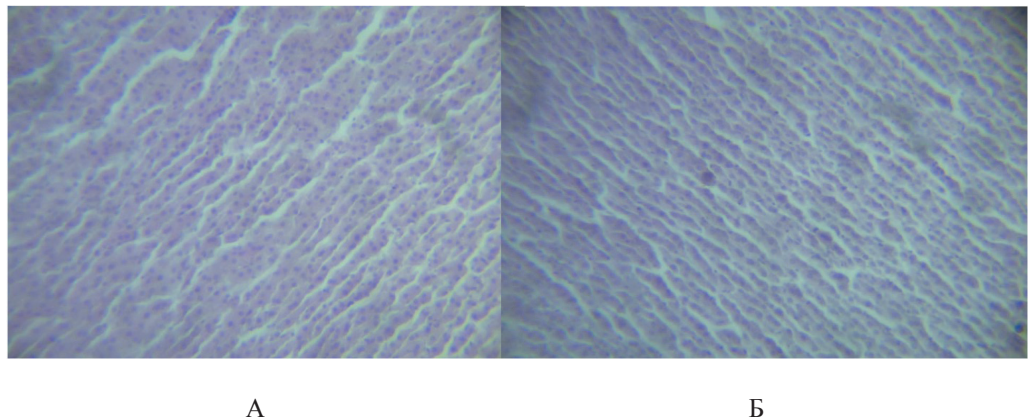


Рис. 1. Гистоструктура печени *Chinchilla lanigera*: А — контрольная группа, Б — опытная группа. Ув. 25×10. Окраска: гематоксилин и эозин.

Fig. 1. Histological parameters of the *Chinchilla lanigera* liver: А — control group, Б — experimental group. Magn. 25×10; hematoxylin and eosin staining

Таблица 2. Морфологические показатели почек *Chinchilla lanigera*, $M\pm m$
Table 2. Morphological parameters of *Chinchilla lanigera* kidneys, $M\pm m$

Группа	Масса		Показатель		
	г	%	Капиллярные клубочки		
			кол-во в поле зрения, шт.	диаметр, мкм	площадь, мм ²
Контрольная	3,2±0,04	0,7±0,04	10,1±0,41	63±1,3	3,0±0,07
Опытная	3,3±0,23	0,6±0,04	10,3±0,90	54±1,1**	2,2±0,06**

Примечание: ** — разница между группами достоверна при $p<0,01$.
Note: ** — difference between the groups is significant at $p<0.01$.

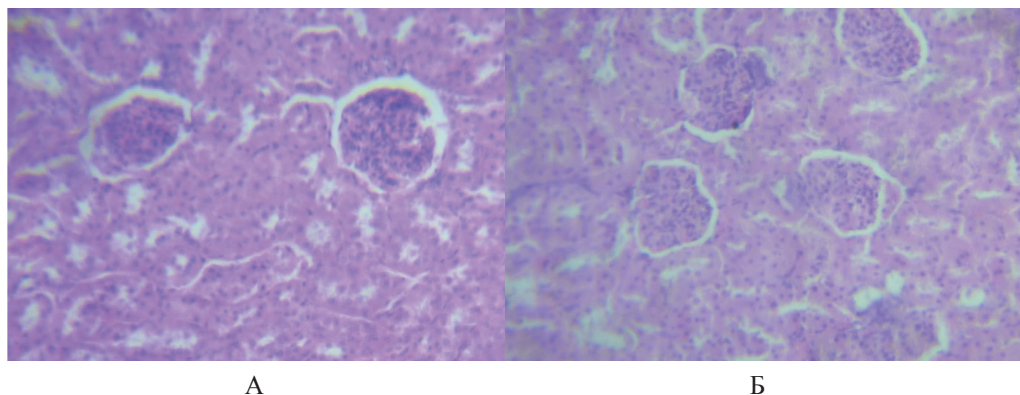


Рис. 2. Гистоструктура почек *Chinchilla lanigera*: А — контрольная группа, Б — опытная группа. Ув. 25×10. Окраска: гематоксилин и эозин.

Fig. 2. Histostructure of *Chinchilla lanigera*, kidneys: А — control group, Б — experimental group. Magn. 25×10. Hematoxylin and eosin staining.

биринт, и почечные тельца округлой формы с хорошо просматриваемыми капсулой, просветом и ядрами. Количество капиллярных клубочков в поле зрения в обеих группах составило в среднем 10 шт. При этом средний диаметр капиллярного клубочка в опытной группе был достоверно меньше на 17% ($p < 0,01$), а его площадь — на 27% ($p < 0,01$) (рис. 2).

Таким образом, длительное введение воды, обогащённой молекулярным водородом, усиливало кровоток в почечных клубочках шиншилл опытной группы, тем самым увеличивая их фильтрационную способность. В печени наблюдалось увеличение объёма ядра и цитоплазмы гепатоцитов, что позволяет предположить о более активно протекающих процессах синтеза и депонирования различных веществ, необходимых для поддержания оптимального функционирования органа. Поскольку в печени и почках экспериментальных животных не было выявлено патологических изменений, связанных с дистрофическими или воспалительными процессами, можно констатировать, что включение в рацион шиншилл воды, обогащённой молекулярным водородом, не оказывает токсического воздействия на организм.

Выводы

1. После длительного введения в рацион малой длиннохвостой шиншиллы воды, обогащённой молекулярным водородом, в печени не выявляются признаки воспалительного процесса, сосуды не расширены, отсутствует венозный застой, гепатоциты крупные с чётко контурированным ядром и объёмистой цитоплазмой, что говорит об интенсивности идущих в них синтетических процессов и положительном влиянии на обмен веществ и состояние организма животного в целом. Установлено, что в результате долгосрочного применения воды, обогащённой молекулярным водородом, площадь почечных клубочков животных опытной группы снизилась на 27% ($p < 0,01$).

2. В почках шиншилл опытной группы не выявляются воспалительные процессы, капиллярные клубочки почечных телец имеют округло-овальную форму, компактны, кровенаполнены, спавшиеся и угловатые клубочки отсутствуют. Дистрофических изменений и почечной недостаточности не наблюдается. Установлено, что в результате долгосрочного применения воды, обогащённой молекулярным водородом, наблюдалось увеличение объёма цитоплазмы в гепатоцитах ($p < 0,01$) и паренхиматозного компонента печени.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Гречушников Е.Ю. Влияние стрессовых ситуаций на здоровье человека. *Молодой учёный*. 2022;16(411):417–420. [Grechushnikov E.Y. Vliyaniye stressovykh situatsiy na zdorov'e cheloveka. [The influence of stressful situations on human health]. *Molodoy uchenyy* [Young Scientist]. 2022;16(411):417–420. (In Russian)].
2. Данилова Д.А., Бричкин Ю.Д., Медведев А.П., Пичугин В.В., Федоров С.А., Таранов Е.В., Назаров Е.И., Рязанов М.В., Большухин Г.В., Дерюгина А.В. Использование молекулярного водорода при операциях на сердце в условиях искусственного кровообращения. *Современные технологии в медицине*. 2021;13(1):71–77. [Danilova D.A., Brichkin Y.D., Medvedev A.P., Pichugin V.V., Fedorov S.A., Taranov E.V., Nazarov E.I., Ryazanov M.V., Bolshukhin G.V., Deryugina A.V. Ispol'zovanie molekulyarnogo vodoroda pri operatsiyakh na serdtse v usloviyakh iskusstvennogo krovoobrashcheniya [Application of molecular hydrogen in heart surgery under cardiopulmonary bypass]. *Sovremennye tekhnologii v meditsine* [Modern Technologies in Medicine]. 2021;13(1):71–77. (In Russian)]. DOI: 10.17691/stm2021.13.1.09
3. Лапин А.А., Каратаев О.Р., Гарифуллин И.Г., Литвинов С.Д., Зеленков В.Н. Перспективы использования молекулярного водорода в экологичной и спортивной медицине (обзор). *Вестник медицинского института «РЕАВИЗ»*. 2021;11(6):33–41. [Lapin A.A., Karatayev O.R., Garifullin I.G., Litvinov S.D., Zelenkov V.N. Perspektivy ispol'zovaniya molekulyarnogo vodoroda v ekologichnoy i sportivnoy meditsine (obzor). *Vestnik meditsinskogo instituta «REAVIZ»* [Bulletin of the Medical Institute «REAVIZ»]. 2021;11(6):33–41. (In Russian)]. DOI: 10.20340/vmi-rvz.2021.6.PHYS.2
4. Рахманин Ю.А., Егорова Н.А., Михайлова Р.И., Рыжова И.Н., Каменецкая Д.Б., Кочеткова М.Г. Молекулярный водород: биологическое действие, возможности применения в здравоохранении (обзор). *Hygiene & Sanitation*. 2019;98(4):359–365. [Rakhmanin Yu.A., Yegorova N.A., Mikhaylova R.I., Ryzhova I.N., Kamenetskaya D.B., Kochetkova M.G. Molekulyarnyy vodorod: biologicheskoe deystvie, vozmozhnosti primeneniya v zdravookhraneni (obzor). [Molecular hydrogen: Biological effects, potential healthcare applications (review)]. *Hygiene & Sanitation*. 2019;98(4):359–365. (In Russian)]. DOI: 10.47470/0016-9900-2019-98-4-359-36
5. *Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях*. Под ред. Н.Н. Каркищенко и др. М.: Профиль-2С, 2010. [*Rukovodstvo po laboratornym zhitvotnym i al'ternativnym modelyam v biomeditsinskikh issledovaniyakh* [Manual on laboratory animals and alternative models in biomedical research]. Ed. by N.N. Karkischenko, et al. Moscow: Profil'-2S Publ., 2010. (In Russian)].
6. Тимофеев Л.В., Сидорова М.В., Панина Е.В., Кулинич Н.В. Откормочные и мясные качества чистопородных и помесных свиней с разной стрессчувствительностью. *Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии*. 2001;3:154–165. [Timofeyev L.V., Sidorova M.V., Panina Ye.V., Kulich N.V. Otkormochnye i myasnye kachestva chistoporodnykh i pomesnykh sviney s raznoy stresschuvstvitel'nost'yu [Fattening and meat qualities of purebred and crossbred pigs with different stress sensitivity]. *Izvestiya Timiryazevskoy sel'skokhozyaystvennoy akademii* [Izvestiya of Timiryazev Agricultural Academy]. 2001;3:154–165. (In Russian)].
7. Фролов В.А. Влияние стрессовых ситуаций на здоровье человека. *Международный журнал гуманитарных и естественных наук*. 2024;1–2(88):85–88. [Frolov V.A. Vliyaniye stressovykh situatsiy na zdorov'e cheloveka [The influence of stressful situations on human health]. *Mezhdunarodnyy zhurnal gumanitarnykh i estestvennykh nauk* [International Journal of Humanities and Natural Sciences]. 2024;1–2(88):85–88. (In Russian)]. DOI: 10.24412/2500-1000-2024-1-2-85-88
8. Щетинина С.Ю. Значение витаминов для здоровой жизнедеятельности человека. *Международный журнал гуманитарных и естественных наук*. 2024;3–3(90):26–31. [Shchetinina S.Yu. Znachenie vitaminov dlya zdorovoy zhiznedeyatel'nosti cheloveka [Importance of vitamins for healthy human life]. *Mezhdunarodnyy zhurnal gumanitarnykh i estestvennykh nauk* [International Journal of Humanities and Natural Sciences]. 2024;3–3(90):26–31. (In Russian)]. DOI: 10.24412/2500-1000-2024-3-3-26-31
9. Lili F., Huayu Ch., Junhui L., Da Ch., Yuexiang H. Controllable synthesis of hydrogen bubbles via aeration method for efficient antioxidant process. *Appl. Nanosci*. 2021;11:833–840. DOI: 10.1007/s13204-020-01652-z
10. Ohta S. The emergence, development, and future mission of hydrogen medicine and biology. In: Slezak J., Kura B. (eds) *Molecular hydrogen in health and disease*. *Advances in Biochemistry in Health and Disease*. Springer Nature Switzerland. 2024;27:451–465. DOI: 10.1007/978-3-031-47375-3_26

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Панина Елена Витальевна, к.б.н., доц., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет — МСХА им. К.А. Тимирязева»;
e-mail: epanina@rgau-msha.ru

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

Остренко Константин Сергеевич, д.б.н., Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания животных — филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста»;
e-mail: Ostrenkoks@gmail.com

Петров Дмитрий Валерьевич*, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: 1941-65@mail.ru

Сорочан Анастасия Евгеньевна, ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет — МСХА им. К.А. Тимирязева»;
e-mail: anasta.sorochan@yandex.ru

Elena V. Panina, Cand. Sci. (Biol.), Assoc. Prof., Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia, Russian State Agrarian University — Moscow Timiryazev Agricultural Academy;
e-mail: epanina@rgau-msha.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

Konstantin S. Ostrenko, Dr. Sci. (Biol.), All-Russian Research Institute of Physiology, Biochemistry and Animal Nutrition — Branch of the Federal Scientific Center of Animal Husbandry — The All-Russian Institute of Animal Husbandry named after Academician L.K. Ernst;
e-mail: Ostrenkoks@gmail.com

Dmitry V. Petrov*, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: 1941-65@mail.ru

Anastasia E. Sorochan, Russian State Agrarian University — Moscow Timiryazev Agricultural Academy;
e-mail: anasta.sorochan@yandex.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

РОЛЬ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ИННОВАЦИЙ В СОЗДАНИИ НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ НА ОСНОВЕ МУСКУСА КАБАРГИ

И.А. Помыткин*, М.Т. Гасанов, В.Н. Каркищенко, М.С. Нестеров, Ю.В. Фокин,
Н.В. Петрова, О.В. Алимкина, Н.Н. Каркищенко

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

Мускус представляет собой высушенный секрет препуциальной железы кабарги, широко применяемый с середины IV века в качестве биостимулятора в традиционной арабской, индийской, тибетской и китайской медицине. В настоящее время осуществляется переход к доказательной медицине, в рамках которой идёт изучение связи состава мускуса с его фармакологическими свойствами. Мускус представляет собой многокомпонентную систему, состоящую из веществ разного класса, на содержание и относительные количества которых непосредственно влияет технология извлечения мускуса. Разработка нового метода — электроимпульсной экстракции — существенно повысила выход экстракта и повлияла на состав мускуса за счёт повышения относительного содержания пептидно-белковой фракции, что обеспечило появление новых свойств мускуса, а именно свойства повышать физическую работоспособность при одновременном повышении безопасности физической нагрузки за счёт подавления состояния воспаления и окислительного стресса, связанных с экстремальной нагрузкой. В целом, прогресс в разработке новых лекарственных средств на основе мускуса кабарги связан с технологическими инновациями в этой области.

Ключевые слова: *Moschus moschiferus*, мускусная железа, газовая хроматография, биологически активные вещества (БАВ), протеомный анализ, липосомальная форма, доклинические исследования, клинические испытания

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: государственное задание по теме «Создание и исследование лекарственного препарата, содержащего стабилизированные в липидах устойчивые наночастицы комплекса биологически активных веществ, выделенных из мускуса кабарги, предназначенного для повышения работоспособности» (шифр: «Технология-2») ФГБУН НЦБМТ ФМБА России.

Для цитирования: Помыткин И.А., Гасанов М.Т., Каркищенко В.Н., Нестеров М.С., Фокин Ю.В., Петрова Н.В., Алимкина О.В., Каркищенко Н.Н. Роль технологических инноваций в создании новых лекарственных средств на основе мускуса кабарги. *Биомедицина*. 2024;20(3E):77–88. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-77-88>

Поступила 11.04.2024

Принята после доработки 13.08.2024

Опубликована 01.11.2024

ROLE OF TECHNOLOGICAL INNOVATIONS IN THE CREATION OF NOVEL DEER MUSK-BASED DRUGS

Igor A. Pomytkin*, Melik T. Gasanov, Vladislav N. Karkischenko, Maxim S. Nesterov,
Yuriy V. Fokin, Natalia V. Petrova, Oksana V. Alimkina, Nikolay N. Karkischenko

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

Musk is a dried secretion of the preputial gland of musk deer, widely used since the middle of the 4th century as a biostimulant in traditional Arabic, Indian, Tibetan, and Chinese medicine. Currently, within the transition to evidence-based medicine, relationships between the composition of musk and its pharmacological properties is being studied. Musk is a multicomponent system consisting of substances of different classes, the content and relative amounts of which are directly affected by the technology of musk extraction. The development of a new method – electropulse extraction – significantly increased the yield of the extract and affected the composition of musk by increasing the relative content of the peptide-protein fraction. This ensured the emergence of new properties of musk, namely the property to increase physical performance while increasing the safety of physical activity by suppressing the state of inflammation and oxidative stress associated with extreme stress. In general, progress in the development of new deer musk-based drugs is associated with technological innovations in this industry.

Keywords: *Moschus moschiferus*, musk gland, gas chromatography, biologically active substances (BAS), proteomic analysis, liposomal form, preclinical studies, clinical studies

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

Funding: the research topic “Creation and study of a medicinal product containing stable nanoparticles of a set of biologically active substances isolated from musk deer musk, stabilized in lipids, intended to improve performance” (code: “Technology-2”) of a state assignment of the SCBMT of FMBA of Russia.

For citation: Pomytkin I.A., Gasanov M.T., Karkischenko V.N., Nesterov M.S., Fokin Yu.V., Petrova N.V., Alimkina O.V., Karkischenko N.N. Role of Technological Innovations in the Creation of Novel Deer Musk-Based Drugs. *Journal Biomed.* 2024;20(3E):77–88. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-77-88>

Submitted 11.04.2024

Revised 13.08.2024

Published 01.11.2024

Введение

Мускус представляет собой высушенный секрет препуциальной железы мускусного мешка, расположенного между пупком и половыми органами половозрелых самцов кабарги, небольшого парнокопытного оленевидного животного из семейства кабарговых (лат. *Moschidae*) [9]. Латинское название семейства происходит от древнегреч. «Μόσχος» — мускус. В России обитает кабарга сибирская (лат. *Moschus moschiferus*), ареал которой захватывает территории Алтая, междуречья Лены и Енисея в Восточной Сибири, Забайкалья, Дальнего Востока и острова Сахалин. С середины IV века мускус кабарги считается одним из наиболее ценных природных биостимуляторов в арабской, индийской, тибетской и китайской медицине. Из-за хищнической добычи мускуса популяция кабарги в мире многократно сократилась, что привело к появлению мер государственной защиты. Так, в Китае, являющемся главным потребите-

лем лекарственного мускуса, кабарга занесена в первую категорию Государственного списка ключевых охраняемых объектов дикой природы, и единственным легальным источником получения мускуса является сельскохозяйственное разведение кабарги. Использование натурального мускуса ограничено только четырьмя патентованными средствами (таблетки Angong Niu Huang Pill, Liushen Pill, Babao Dan и Pien Tze Huang), и создан искусственный мускус, за разработку которого была присуждена Первая Национальная премия Китая за прогресс в области науки и технологий в 2015 г. [11]. В России сельскохозяйственное разведение кабарги в условиях естественной среды обитания проводится на базе питомника филиала «Алтайский» Научного центра биомедицинских технологий ФМБА России (Республика Алтай).

Мускус кабарги традиционно использовался в составе многокомпонентных препаратов для поддержания жизнедея-

тельности и активного долголетия с широчайшим заявленным спектром применения — от заживления ран и язв до лечения инфекционных, онкологических и неврологических заболеваний. В настоящее время подходы к применению мускуса изменились. Мускус рассматривается как ценное фармацевтическое сырьё для лекарственных препаратов, разрабатываемых уже на принципах доказательной медицины, когда эффективность и безопасность мускуса и его компонентов оценивается, исходя из имеющихся научных доказательств. Уже в рамках новых подходов к настоящему времени показано, что мускус и его компоненты проявляют противовоспалительную и противоопухолевую активность, а также обладают свойствами нейропротектора и кардиопротектора [11]. Основными направлениями в создании препаратов с использованием мускуса стали болезни сосудов, ишемическая болезнь сердца и ишемический инсульт. В глобальном реестре клинических испытаний (<https://clinicaltrials.gov>) зарегистрировано восемь исследований таблетированных препаратов мускуса для лечения ишемического инсульта (NCT00817609), ишемической болезни сердца (NCT01897805, NCT04897126, NCT04984954, NCT03072121, NCT04026724, NCT04022031), шейной радикулопатии (NCT03219515) и одно исследование наружного средства для лечения геморроя (NCT01881282). В Китайском реестре клинических испытаний (<http://www.chictr.org.cn>) зарегистрировано пятнадцать исследований таблетированных препаратов мускуса, направленных на лечение сердечно-сосудистых заболеваний (ChiCTR2000035167, ChiCTR2000032429, ChiCTR1900025810, ChiCTR-IPC-17010823, ChiCTR-IPR-16009785, ChiCTR-IPR-16008950, ChiCTR-IPR-15006020, ChiCTR2000041451, ChiCTR1900027946, ChiCTR-TRC-10001237, ChiCTRTRC-12003513, ChiCTR2000034817, ChiCTR2000037470). В России идёт клиническое исследова-

ние III фазы таблетированного препарата «Мускулив» по показанию лечения эректильной дисфункции у мужчин.

Почти исключительным путём введения препаратов мускуса кабарги остаётся традиционное пероральное введение таблетированных лекарственных форм, что не позволяет в полной мере использовать лечебный потенциал мускуса из-за метаболизма биологически активной пептидно-белковой фракции мускуса в желудочно-кишечном тракте и при первом пассаже через печень.

Перспективы в создании новых лекарственных средств на основе мускуса кабарги связаны с улучшением технологии извлечения мускуса как ценного фармацевтического сырья, с изучением состава мускуса и выявлением фармакологических активностей отдельных компонентов мускуса, а также разработкой новых лекарственных форм, повышающих биодоступность отдельных компонентов мускуса.

Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства (НЦБМТ ФМБА России) является единственным научным центром в России, который занимается всем комплексом работ, необходимых для реализации полного технологического цикла создания и получения лекарственных препаратов на основе мускуса кабарги. В настоящей работе суммированы основные подходы и результаты НЦБМТ ФМБА России, относящиеся к созданию технологии получения лекарственных препаратов на основе мускуса кабарги.

Получение сырья мускуса кабарги

Получение сырья мускуса кабарги организовано на базе питомника для разведения кабарги в условиях естественной среды обитания (филиал «Алтайский» НЦБМТ ФМБА России, Республика Алтай), рассчитанного на содержание более 200 особей кабарги. Для получения высококачественного сырья мускуса разработаны методы атравматичного отлова животных [10],

транспортировки и передержки кабарги, временной её иммобилизации, а также прижизненного отбора мускуса, проведён зоотехнический анализ функциональных параметров вольерного содержания кабарги [1], изучены пищевые предпочтения кабарги [3]. Проведено изучение влияния рациона питания животных на содержание биологически активных веществ в мускусе [4, 7].

Технологии извлечения мускуса из препуциальной железы кабарги

Для экстракции биологически активных веществ мускуса кабарги из препуциальной железы в НЦБМТ ФМБА России разработаны два основных метода. Традиционная ультразвуковая экстракция позволяет извлекать до 50% по массе биологически активных веществ. В качестве нового метода в НЦБМТ ФМБА России была разработана электроимпульсная экстракция, что позволило значительно увеличить выход биологически активных фракций мускуса (до 80% по массе), и в настоящий момент является методом выбора для получения экстрактов мускуса кабарги. В дополнение к увеличению выхода экстракта электроимпульсная экстракция даёт возможность более полного извлечения пептидной фракции мускуса, что является достоинством этого нового метода. Несмотря на то, что пептидная фракция мускуса ранее не рассматривалась в качестве полезной составляющей мускуса, исследования НЦБМТ ФМБА России показали, что использование этой фракции позволяет существенно расширить спектр применения препаратов мускуса по новым показаниям, неизвестным из практики традиционного применения мускуса кабарги.

Состав мускуса кабарги

Мускус кабарги — это многокомпонентная композиция биологически активных веществ, представленная в основном четырьмя классами соединений:

- алифатическими и ароматическими кислотами, эфирами и восками;

- липидами;
- стероидными соединениями;
- небольшими белками и пептидами [5].

Анализ летучей фракции мускуса после дериватизации с использованием газовой хроматографии с ион-селективным детектором показал, что в состав этой фракции входят 93 вещества, причём жирные кислоты и их производные составляют основу летучей фракции (52%); на втором месте — стероидные соединения, преимущественно андростероны (7%) и производные циклических углеводов (7%), далее следуют кетоны и альдегиды (4,5%), эйкозаноиды и простаноиды (3,8%), многоатомные спирты (2,3%), минорные фракции производных фенола, феногиазина, пирролидина, пиридина и фумаровой кислоты. Мажорные компоненты этой летучей фракции мускуса кабарги представлены на рис. 1.

Сравнительный анализ образцов мускуса кабарги сибирской, полученных от животных питомника «Алтайский», с образцами мускуса кабарги китайской (Gold) показал, что между этими образцами имеются существенные отличия в составе. Мускус кабарги китайской содержит меньше компонентов (29 вместо 93) и не содержит андростанов, обнаруженных в мускусе животных из питомника «Алтайский». Это указывает на возможные различия в спектре фармакологической активности этих мускусов и предопределяет различие в показаниях к применению лекарственных препаратов, сделанных на их основе. Причина выявленных различий может быть связана не только с внутривидовыми различиями в метаболизме секрета препуциальной железы кабарги, но, по-видимому, в значительной мере определяется техническими условиями, такими как питание и содержание кабарги, способ извлечения и фракционирования мускуса препуциальной железы, что в целом указывает на ключевую роль технологии получения фармацевтического сырья на основе мускуса кабарги.



Рис. 1. Мажорные компоненты мускуса кабарги [5].
Fig. 1. Major components of musk deer musk [5].

Отличительной особенностью мускуса кабарги сибирской, полученного в филиале «Алтайский» НЦБМТ ФМБА России, является наличие стероидной фракции, богатой андростанами (рис. 2).

Мускус кабарги сибирской, полученный в филиале «Алтайский» НЦБМТ ФМБА России, содержит пептидно-белковую фракцию [6]. Протеомный анализ фракции показал наличие 66 компонентов, имеющих структурное сходство с известными белками и пептидами, для которых определена их функциональная активность, включая ферментативную, гидролизную, оксидоредуктазную, трансферазную, регуляторную активность (препроноцицептин) и др. (рис. 3).

Клинические исследования препарата «Мускулив»

Опираясь на полученные данные о составе мускуса кабарги сибирской, была изготовлена субстанция мускуса и разработана таблетированная лекарственная форма препарата «Мускулив» для лечения эректильной дисфункции. Субстанция была получена методом ультразвуковой экстракции сырья препуциальной железы, полученного от животных, содержащихся в питомнике «Алтайский» НЦБМТ ФМБА России, с последующей лиофилизацией экстракта. Безопасность применения препарата «Мускулив» на здоровых добровольцах была продемонстрирована результатами I фазы

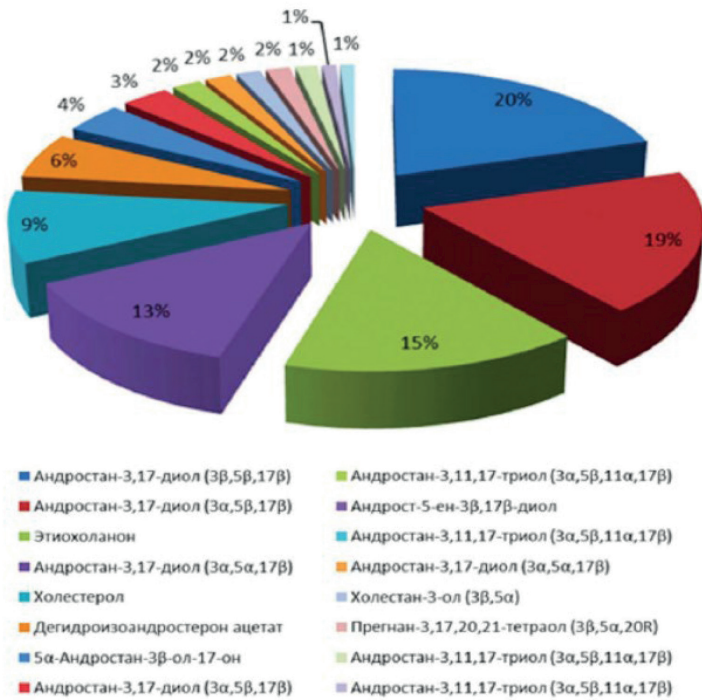


Рис. 2. Профиль андростанов в составе стероидной фракции мускуса кабарги сибирской [5].
Fig. 2. Profile of androstanes in the steroid fraction of Siberian musk deer musk [5].

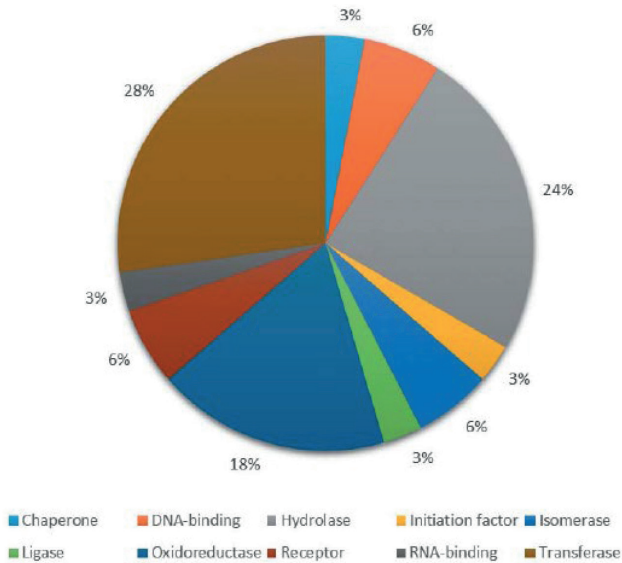


Рис. 3. Группы белков из экстрактов мускуса кабарги [6].
Fig. 3. Groups of proteins from musk deer musk extracts [6].

клинических исследований. Результаты двойного слепого плацебо-контролируемого рандомизированного клинического исследования II фазы показали эффективность препарата «Мускулив» в лечении эректильной дисфункции. Исследование проводилось в четырёх клинических центрах. Первичной конечной точкой эффективности препарата была доля пациентов, принимавших препарат «Мускулив» и достигших нормы эректильной функции по индексу МИЭФ (≥ 25 баллов) по сравнению с плацебо. Дизайн исследования предусматривал участие 135 пациентов, разделённых методом рандомизации на три группы, по 45 человек в каждой:

- 1-я группа (n=45): Мускулив, по 1 табл. в течение 28 дней;
- 2-я группа (n=45): Мускулив, по 1 табл. в течение 14 дней, затем плацебо, по 1 табл. в течение последующих 14 дней;
- 3-я группа (n=45): Плацебо, по 1 табл. в течение 28 дней.

Было установлено, что препарат «Мускулив» (табл., 150 мг), при приёме одной таблетки в течение 28 дней показывает статистически значимое повыше-

ние в 5,3 раза доли пациентов с полным восстановлением функции по сравнению с плацебо ($p=0,0014$, точный критерий Фишера, рис. 4).

На основе результатов II фазы клинического исследования препарата «Мускулив» было принято решение о проведении III фазы исследования — многоцентровое рандомизированное сравнительное проспективное плацебо-контролируемое исследование по изучению эффективности и безопасности препарата Мускулив, таблетки 150 мг, при лечении пациентов с эректильной дисфункцией, в котором принимают участие 250 пациентов.

Новые подходы к разработке препаратов мускуса кабарги, обогащённых пептидами и белками

Исторически мускус кабарги применялся и сейчас применяется в составе препаратов для перорального введения. Однако обнаружение в составе мускуса кабарги сибирской пептидно-белковой фракции, содержание которой особенно увеличивается при использовании нового метода электроимпульсной экстракции мускуса, требует изменения способа введения мускуса в организм человека. Пероральное введение веществ с пептидной связью ограничивает их биодоступность из-за быстрого гидролиза специализированными пептидазами стенки кишки и метаболизма в печени при первом проходе. Для увеличения биодоступности пептидной фракции мускуса в НЦБМТ ФМБА России используется два основных технологических приёма. Мускус стабилизируется в составе липосом, обеспечивающих улучшение параметров всасывания пептидных компонентов мускуса через слизистые полости рта, и вместо перорального введения используется трансмукозальное введение препарата (сублингвальное, буккальное или транспалатинальное). Сочетание этих приёмов позволяет увеличить биодоступность пептидной фракции мускуса и начать использование мускуса

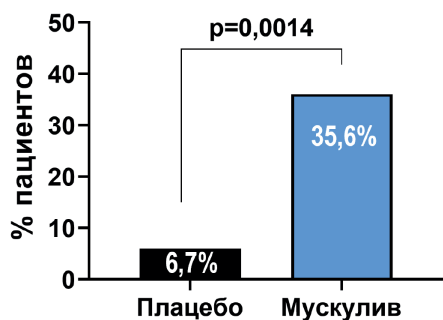


Рис. 4. Доля пациентов, принимавших плацебо или Мускулив и достигших нормы эректильной функции по индексу МИЭФ (≥ 25 баллов).

Fig. 4. The proportion of patients taking placebo or Musculiv and those having achieved normal erectile function according to the IEF index (≥ 25 points).

кабарги по новым показаниям, вытекающим из потенциальной активности отдельных пептидных компонентов мускуса.

Особенности влияния мускуса кабарги на физическую работоспособность

Наличие в составе мускуса кабарги пептидных регуляторов определённых классов [6] указывает на обоснованность проведения исследований препаратов мускуса для повышения физической работоспособности. С этой целью был разработан препарат мускуса кабарги, стабилизированный в липосомах для увеличения биодоступности пептидной фракции мускуса при трансмукозальном введении. Исследование работоспособности проводилось на крысах Wistar с использованием кинезогидродинамической модели плавания. Крысы получали транспалатинально липосомированный экстракт мускуса кабарги — ЛМК (n=20) или плацебо (n=20) в течение 14 сут. [2]. Определяли работоспособность животных в тесте плавания до отказа (дни: 0-й («до»), 7-й, 14-й, 21-й) относительно контроля: среднее время плавания, среднее количество заплывов и общее расстояние. Результаты представлены на рис. 5.

Особенностью этого препарата мускуса является то, что характерный эффект работы до отказа, а именно возникновение провоспалительного состояния, не наблюдается в случае использования мускуса кабарги, что отличает его от других препаратов. Эффект воспаления при работе до отказа изучался на минипигах [8]. Минипиги получали в течение 7 дней плацебо или липосомированный мускус кабарги транспалатинально, на следующий день выполнялся тест работы до отказа и измерялись уровни нейтрофилов в крови и экспрессия мРНК гена *NFE2L2*, кодирующего фактор NRF2, отвечающий за экспрессию и биосинтез пула ферментов-антиоксидантов (рис. 6).

В контрольной группе работа до отказа вызвала провоспалительное состояние, ха-

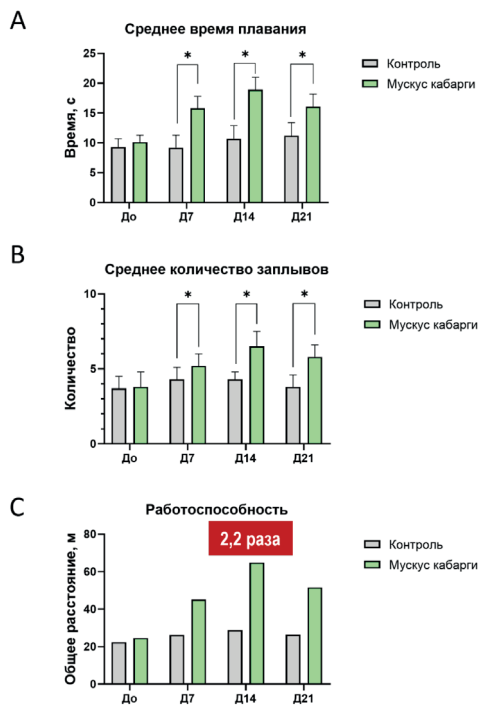
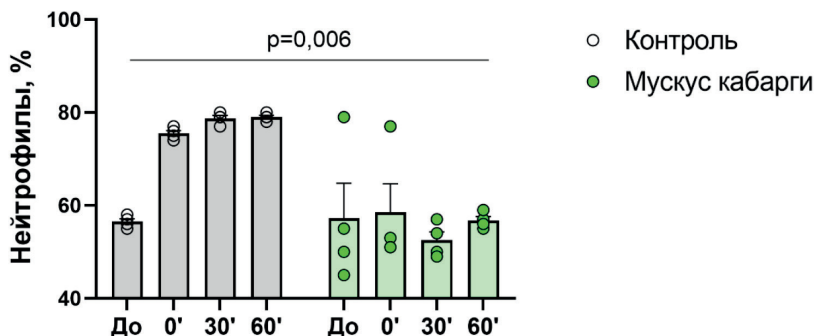


Рис. 5. Влияние липосомального препарата мускуса кабарги при курсовом 14-дневном транспалатинальном введении на показатели работоспособности и выносливости крыс в кинезогидродинамической модели плавания. * — $p < 0,05$.

Fig. 5. Effect of liposomal preparation of musk deer musk with a 14-day course of transpalatine administration on the indices of performance and endurance of rats in a kinesohydrodynamic swimming model. * — $p < 0,05$.

рактеризующееся повышением уровня нейтрофилов в крови и пониженной экспрессией NRF2, что соответствует возникновению провоспалительного состояния с предрасположенностью к возникновению окислительного стресса. В группе животных, принимавших мускус кабарги, напротив, работа до отказа не привела к повышению нейтрофилов ($F_{1,6}=7,987$; $p=0,0301$; двухфакторный анализ ANOVA с повторными измерениями) и снижению экспрессии мРНК *NFE2L2* ($F_{1,6}=16,74$; $p=0,0064$; двухфакторный анализ ANOVA с повторными измерениями) в сравнении с контролем,

А



В

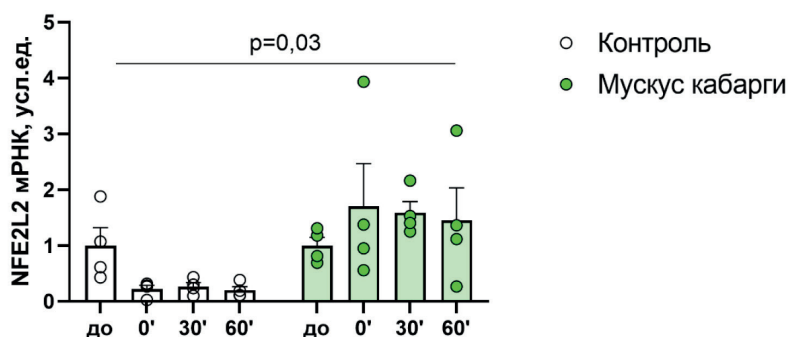


Рис. 6. Влияние липосомального препарата мускуса кабарги при курсовом 7-дневном транспалатальном введении на уровни нейтрофилов в крови (А) и экспрессию мРНК гена, кодирующего фактор NRF2 (В), до и на 0-й, 30-й и 60-й минуте после окончания физической нагрузки в тесте работы до отказа.

Fig. 6. Effect of liposomal preparation of musk deer musk with a 7-day course of transpalatine administration on the levels of neutrophils in the blood (A) and the expression of mRNA of the gene encoding the NRF2 factor (B) before and at 0, 30, and 60 min after the end of physical exercise in a work-to-failure test.

что указывает на выраженный защитный эффект мускуса при физической работе. Таким образом, трансмукозальный приём липосомированного мускуса кабарги, с одной стороны, повышает работоспособность животных и, в то же время, препятствует возникновению провоспалительного состояния, что снижает риски травм и повреждений воспалительного характера, например, тендинопатий. Препаратов с таким профилем действия на рынке средств повышения работоспособности не существует, что говорит об уникальных свойствах мускуса кабарги.

Перспективы разработки лекарственных препаратов на основе мускуса кабарги

Прогресс в области разработки лекарственных средств на основе мускуса кабарги связан с переходом от традиционной практики применения мускуса кабарги к применению, основанному на принципах доказательной медицины. Анализ состава мускуса кабарги из разных источников показывает наличие существенных различий, что не может быть объяснено различиями между животными из разных ареалов, но связано с несовершенством технологии

получения препаратов мускуса. Переход от обычной ультразвуковой экстракции мускуса из сырья препуциальной железы к новому методу электроимпульсной экстракции обеспечивает не только повышение выхода биологически активных веществ, но и меняет состав извлекаемых фракций, что предопределяет появление новых свойств мускуса и появление соответствующих новых показаний к его применению. Яркой иллюстрацией влияния технологических усовершенствований на появление новых свойств мускуса кабарги служат результаты исследования физической работоспособности препаратов мускуса, которые показали наличие необычных свойств мускуса с обогащённой пептидной фракцией, полученной методом

электроимпульсной экстракции. Этот препарат мускуса не только значительно повышал физическую работоспособность, но и снижал негативные факторы физической нагрузки в условиях работы до отказа, такие как индуцированное нагрузкой провоспалительное состояние и предрасположенность к окислительному стрессу. Это уникальное сочетание свойств мускуса неизвестно ни для какого другого препарата. В целом, прогресс в области создания новых лекарственных средств на основе мускуса кабарги связан с внедрением новых технологических приёмов извлечения и фракционирования мускуса, позволяющим расширение применения препаратов мускуса по новым, неизвестным ранее показаниям.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Борисова М.М., Чечушков М.А., Нестеров М.С. Зоотехнический анализ функциональных параметров вольерного содержания кабарги с целью повышения качественного состава мускуса. *Биомедицина*. 2021;17(3):29–33. [Borisova M.M., Chechushkov M.A., Nesterov M.S. Zootekhnicheskii analiz funktsional'nykh parametrov vol'ernogo sodержaniya kabargi s tsel'yu povysheniya kachestvennogo sostava muskusa [A zootechnical analysis of the functional parameters of grazing kabarga deer with the purpose of increasing the musk quality]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2021;17(3):29–33. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-17-3-29-33
2. Гасанов М.Т., Фокин Ю.В., Люблинский С.Л., Алимкина О.В., Таболякова Л.А., Каркищенко В.Н. Доклинические исследования эффективности и безопасности комплекса биологически активных веществ, выделенных из мускуса кабарги сибирской, в липосомированной лекарственной форме. *Биомедицина*. 2022;18(4):48–62. [Gasanov M.T., Fokin Yu.V., Lyublinkiy S.L., Alimkina O.V., Taboyakova L.A., Karkischenko V.N. Doklinicheskie issledovaniya effektivnosti i bezopasnosti kompleksa biologicheskii aktivnykh veshchestv, vydelennykh iz muskusa kabargi sibirskoy, v liposomirovannoy lekarstvennoy forme [Active substances isolated from the secretion of Siberian musk deer in a liposomal dosage form]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2022;18(4):48–62. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-18-4-48-62
3. Зубалий А.М., Гусева М.М. Пищевые предпочтения вольерной кабарги сибирской — продуцента фармацевтического сырья. *Биомедицина*. 2023;19(3):10–16. [Zubalii A.M., Guseva M.M. Pishchevye predpochteniya vol'ernoy kabargi sibirskoy — produtsenta farmatsevticheskogo syr'ya [Food preferences of captive Siberian musk deer — a producer of pharmaceutical raw materials]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2023;19(3):10–16. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-19-3-10-16
4. Зубалий А.М., Нестеров М.С., Каркищенко В.Н., Хвостов Д.В., Агельдинов Р.А., Огнев С.В. Содержание биологически активных веществ в мускусе кабарги сибирской в зависимости от спектра питания животных. *Биомедицина*. 2022;18(4):24–38. [Zubalii A.M., Nesterov M.S., Karkischenko V.N., Khvostov D.V., Ageldinov R.A., Ognev S.V. Soderzhanie biologicheskii aktivnykh veshchestv v muskuse kabargi sibirskoy v zavisimosti ot spektra pitaniya zhivotnykh [Content of biologically active substances in the musk of Siberian musk deer depending on food spectrum of animal nutrition]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2022;18(4):24–38. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-18-4-24-38
5. Каркищенко В.Н., Дуля М.С., Хвостов Д.В., Агельдинов Р.А., Люблинский С.Л. Анализ биологически активных соединений мускуса кабарги (*Moschus moschiferus*) методом газовой хроматографии с масс-селективным детектором. *Биомедицина*. 2018;1:19–39. [Karkischenko V.N., Dulya M.S., Khvostov D.V., Ageldinov R.A., Lyublinkiy S.L. Analiz biologicheskii aktivnykh soedineniy muskusa kabargi (*Moschus moschiferus*) metodom gazovoy khromatografii s mass-selektivnym detektorom [Analysis of biologically active musk compounds of musk deer (*Moschus moschiferus*) by gas chroma-

- tography with mass selective detector]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2018;1:19–39. (In Russian)].
6. Каркищенко В.Н., Дуля М.С., Хвостов Д.В., Агельдинов Р.А., Люблинский С.Л. Протеомный анализ в идентификации белковых компонентов препуциальной железы кабарги сибирской. *Биомедицина*. 2019;1:35–47. [Karkischenko V.N., Dulya M.S., Khvostov D.V., Ageldinov R.A., Lyublinskiy S.L. Proteomnyy analiz v identifikatsii belkovykh komponentov preputial'noy zhelezy kabargi sibirskoy [Proteomic analysis in the identification of active components in the preputial gland secretion of the Siberian musk deer]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2019;1:35–47. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-15-1-35-47
 7. Каркищенко Н.Н., Петрова Н.В., Каркищенко В.Н., Слободенюк В.В., Воронова М.И., Фокин Ю.В. Сравнительное медико-генетическое исследование мускуса кабарги сибирской (*Moschus moschiferus*). *Биомедицина*. 2018;1:6–18. [Karkischenko N.N., Petrova N.V., Karkischenko V.N., Voronova M.I., Fokin Yu.V. Sravnitel'noe mediko-geneticheskoe issledovanie muskusa kabargi sibirskoy (*Moschus moschiferus*) [Comparative medical and genetic study of musk of Siberian musk deer (*Moschus moschiferus*)]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2018;1:6–18. (In Russian)].
 8. 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. [Karkischenko V.N., Pomytkin I.A., Petrova N.V., Vasil'eva I.A., Alimkina O.V., Stankova N.V., Laryushina N.A. Otsenka effektivnosti sredstv korrektsii sostoyaniya zhivotnykh v usloviyakh istoshchayushchikh fizicheskikh nagruzok po kletochnym i geneticheskim biomarkeram [Evaluation of approaches for correcting the state of animals under debilitating physical exertion by cellular and genetic biomarkers]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2023;19(4):8–24. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-19-4-8-24
 9. Приходько В.И. *Кабарга: происхождение, систематика, экология, поведение и коммуникация*. М.: ГЕОС, 2023. [Prikhodko V.I. *Kabarga: proiskhozhdenie, sistematika, ekologiya, povedenie i kommunikatsiya* [Musk deer: Origin, systematics, ecology, behavior and communication]. Moscow: GEOS Publ., 2023. (In Russian)].
 10. Чечушков М.А., Капанадзе Г.Д., Петрова Н.В., Ревякин А.О. Таксономическая характеристика кабарги (*Moschus moschiferus*), разработка и совершенствование методов её отлова в дикой природе. *Биомедицина*. 2017;4:4–17. [Chechushkov M.A., Kapanadze G.D., Petrova N.V., Revyakin A.O. Taksonomicheskaya kharakteristika kabargi (*Moschus moschiferus*), razrabotka i sovershenstvovanie metodov ee otlova v dikoy prirode [The taxonomical characteristics of a musk deer (*Moschus moschiferus*), development and improvement of methods for its catching in the wild]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2017;4:4–17. (In Russian)].
 11. Liu K., Xie L., Deng M., Zhang X., Luo J., Li X. Zoology, chemical composition, pharmacology, quality control and future perspective of Musk (*Moschus*): A review. *Chin. Med.* 2021;16(1):46. DOI: 10.1186/s13020-021-00457-8

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

Гасанов Мелик Тофикович, к.м.н., доц.,
ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: m.gasanov@scbmt.ru

Melik T. Gasanov, Cand. Sci. (Med.), Assoc.
Prof., Scientific Center of Biomedical Technologies
of the Federal Medical and Biological Agency
of Russia
e-mail: m.gasanov@scbmt.ru

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

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

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

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

Фокин Юрий Владимирович, к.б.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: fokin@scbmt.ru

Yuriy V. Fokin, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: fokin@scbmt.ru

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

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

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

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

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

Nikolay N. Karkischenko, Corr. Member of the Russian Academy of Sciences, Acad. of the Russian Academy of Rocket and Artillery Sciences, Dr. Sci. (Med.), Prof., 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

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВЛИЯНИЯ ХЛОРАЛГИДРАТА И ТРИБРОМЭТАНОЛА НА ЭЛЕКТРОНЕЙРОМИОГРАФИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ У МЫШЕЙ

В.А. Приходько^{1,2,*}, Т.М. Матузок^{1,2}, Н.О. Селизарова¹, С.В. Оковитый^{1,2}

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

197376, Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 14, лит. А

² ФГБУН Институт мозга человека им. Н.П. Бехтерева РАН

197376, Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12, лит. А

Выбор оптимального режима общей анестезии является актуальной проблемой при проведении электрофизиологических исследований на лабораторных животных. В настоящей работе проведена сравнительная оценка влияния двух часто используемых в доклинической практике общих анестетиков — хлоралгидрата (ХГ) и трибромэтанола (ТБЭ) — на показатели функции нейромышечного аппарата у беспородных мышей. Установлено, что ХГ и ТБЭ оказывают различное влияние на проводимость периферических нервов и восстановление сократимости скелетной мышцы после утомления электростимуляцией.

Ключевые слова: хлоралгидрат, трибромэтанол, общие анестетики, электронейромиография

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Приходько В.А., Матузок Т.М., Селизарова Н.О., Оковитый С.В. Сравнительная характеристика влияния хлоралгидрата и трибромэтанола на электронейромиографические параметры у мышей. *Биомедицина*. 2024;20(3E):89–93. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-89-93>

Поступила 15.04.2024

Принята после доработки 05.08.2024

Опубликована 01.11.2024

COMPARATIVE ANALYSIS OF EFFECTS OF CHLORAL HYDRATE AND TRIBROMOETHANOL ON ELECTRONEUROMYOGRAPHIC PARAMETERS IN MICE

Veronika A. Prikhodko^{1,2,*}, Tatyana M. Matuzok^{1,2},
Natalya O. Selizarova¹, Sergey V. Okovitiy^{1,2}

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

² N.P. Bechtereva Institute of the Human Brain of the Russian Academy of Sciences
197376, Russian Federation, St. Petersburg, Akademika Pavlova Str., 12, lit. A

Selection of an optimal general anesthesia regimen is an essential prerequisite for the conduction of electrophysiological tests in laboratory animals. In this work, we compared the effects of two general anesthetic drugs commonly used in preclinical studies, i.e., chloral hydrate (CH) and tribromoethanol (TBE), on the parameters of neuromuscular function in outbred mice. CH and TBE were found to distinctly affect peripheral nerve conductivity and skeletal muscle contractility recovery following electrical stimulation-induced fatigue.

Keywords: chloral hydrate, tribromoethanol, general anesthetics, electroneuromyography

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

For citation: Prikhodko V.A., Matuzok T.M., Selizarova N.O., Okovitiy S.V. Comparative Analysis of Effects of Chloral Hydrate and Tribromoethanol on Electroneuromyographic Parameters in Mice. *Journal Biomed.* 2024;20(3E):89–93. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-89-93>

Submitted 15.04.2024

Revised 05.08.2024

Published 01.11.2024

Введение

Общая анестезия и анальгезия являются необходимым условием при проведении большинства электрофизиологических исследований на мелких лабораторных животных. Используемые при этом препараты оказывают существенное влияние на получаемые результаты путём изменения спонтанной и вызванной электрической активности головного мозга, проводимости нервных волокон, сократимости скелетной мускулатуры, дыхательной и сердечной функции, оксигенации крови, температуры тела и других параметров [3]. Таким образом, выбор способа и режима анестезии является важнейшим аспектом дизайна экспериментов, включающих электрофизиологические исследования *in vivo*.

Хлоралгидрат (2,2,2-трихлорэтандиол-1,1; ХГ) и 2,2,2-трибромэтанол (Авертин®; ТБЭ) — галогенированные производные спиртов, широко используемые для проведения общей анестезии у грызунов путём инъекционного (внутрибрюшинного, реже — внутривенного) введения. Их преимуществами являются быстрота индукции и достаточная глубина наркоза, доступность и простота в использовании [3]. В настоящей работе приведены результаты сравнительной оценки влияния ХГ и ТБЭ в стандартных режимах введения на некоторые электронеуромиографические (ЭНМГ) показатели у беспородных мышей.

Материалы и методы

Исследование проводили в соответствии с Базельской декларацией и Правилами

надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств после одобрения биоэтической комиссией ФГБОУ ВО СПбФУ Минздрава России. Эксперименты были выполнены на 10 взрослых (4 мес.) белых беспородных мышак-самках массой 22–30 г, полученных из ФГУП НИЦ «Курчатовский институт» — питомник лабораторных животных «Рапполово» (Ленинградская обл.) одной партией и прошедших карантин в течение 14 дней.

Перед проведением первого ЭНМГ-исследования мышей наркотизировали ХГ («MilliporeSigma», США; 400 мг/кг внутривенно). Исследование проводили методом стимуляционной ЭНМГ с помощью 4-канальной электронеуромиографа Нейро-МВП-4 и программы Нейро-МВП.NET 3.7.3.7 (ООО «Нейрософт», Россия). Регистрировали моторные ответы (М-ответы) икроножной мышцы *m. gastrocnemius* на стимуляцию седалищного нерва *n. ischiadicus* слева и двуглавой мышцы плеча *m. biceps brachii* на стимуляцию мышечно-кожного нерва *n. musculocutaneus* справа [4]. Стимуляцию нервов осуществляли при прямоугольной форме стимула и длительности 0,1 мс в диапазоне сил тока от 1 до 10 мА с последовательным увеличением с шагом 1 мА до достижения супрамаксимальной величины. Измеряли значения максимальной амплитуды (мВ) и площади (мВ×мс), средней латентности и длительности М-ответа (мс), а также сил тока, вызывавших М-ответы с минимальной и максимальной амплитудами (мА).

Измерение скорости проведения импульса (СПИ) (м/с) по левому *n. ischiadicus* проводили в соответствии с методикой [5]. Анализ декрементов амплитуды М-ответов при ритмической стимуляции нерва, а также восстановления сократимости *m. gastrocnemius* после электростимуляционного утомления проводили в соответствии с опубликованными ранее протоколами [1, 2]. Через 1 неделю повторяли ЭНМГ-исследование с предварительной наркотизацией ТБЭ («MilliporeSigma», США; 500 мг/кг внутривенно).

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программного обеспечения Prism 10.2.0 («GraphPad Software», США). Нормальность распределения количественных признаков проверяли с помощью критерия Шапиро — Уилка. При нормальном распределении количественных признаков значимость различий оценивали с помощью критерия Стьюдента для парных выборок, при распределении, отличном от нормального, — с помощью

критерия знаковых рангов Уилкоксона. Порог статистической значимости устанавливали на уровне $p < 0,05$. Числовые данные на графиках представлены в виде средних арифметических; планки погрешностей отражают стандартные ошибки средних.

Результаты исследований

При использовании в качестве анестетика ХГ или ТБЭ не было обнаружено значимых различий параметров М-ответов *m. gastrocnemius*. При наркотизации ТБЭ полученные значения СПИ по *n. ischiadicus* значительно превышали таковые при использовании ХГ ($p < 0,01$) (рис.). Единственным значимым различием при проведении ритмической стимуляции было более высокое среднее значение инкремента амплитуды 10-го М-ответа при использовании ТБЭ, нежели ХГ (частота стимуляции 1 Гц; $p < 0,05$), однако оба значения при этом находились в границах физиологического диапазона, что позволяет данное изменение считать несущественным.

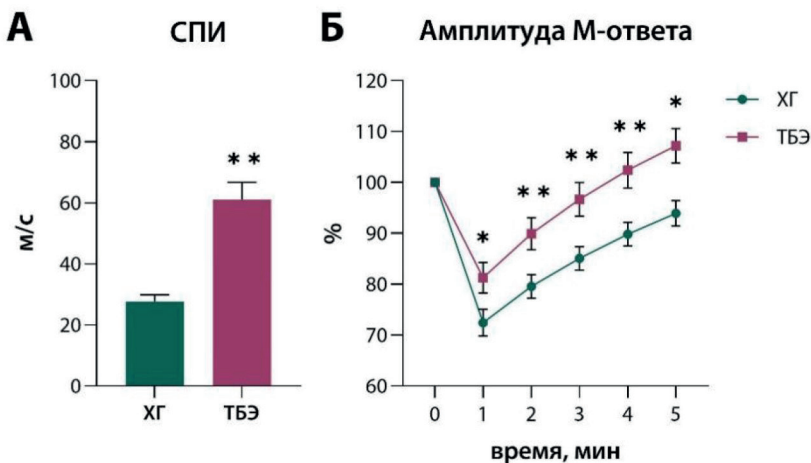


Рис. Скорость проведения импульса (СПИ) по седалищному нерву (А) и динамика восстановления амплитуды М-ответа икроножной мышцы после её электростимуляционного утомления (Б) при использовании в качестве анестетика хлоралгидрата (ХГ) или 2,2,2-трибромэтанола (ТБЭ). * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$.

Fig. Sciatic nerve conduction (СПИ) velocity (А) and M-wave amplitude recovery rates following electrical stimulation-induced fatigue of the gastrocnemius muscle (Б) using either chloral hydrate (ХГ) or 2,2,2-tribromoethanol (ТБЭ) for anaesthesia. * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$.

При использовании ТБЭ падение амплитуды М-ответа мышцы в результате электростимуляционного утомления составляло 18,73% против 27,57% при анестезии ХГ ($p<0,05$). В период восстановления после утомления амплитуда М-ответа возрастала с одинаковой динамикой для обоих препаратов, в связи с чем её значения при использовании ТБЭ во всех контрольных точках превышали таковые при введении ХГ ($p<0,01$). Характерным для ТБЭ, но не ХГ эффектом было превышение амплитуды, измеренной через 5 мин после окончания периода утомления, фоновой в среднем на 7,2% (рис.).

Выводы

ХГ и ТБЭ не отличаются между собой по влиянию на параметры моторных ответов скелетных мышц при стимуляции одиночными стимулами и ритмической стимуляции, но оказывают различное влияние на СПИ по периферическим нервам и восстановление сократимости мышц после электростимуляционного утомления. Возможности и особенности применения ХГ и ТБЭ в качестве общих анестетиков при проведении ЭНМГ-исследований требуют дальнейшего изучения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Приходько В.А., Алексеева Ю.С., Болотова В.Ц. Влияние тренировочного режима на восстановление сократительной способности мышц после электростимуляционного утомления у мышей. *Мат-лы XXIII Межд. научно-практ. конф. студентов и молодых учёных «Студенческая медицинская наука XXI века»*. 2023:261–264. [Prihod'ko V.A., Alekseeva Yu.S., Bolotova V.C. Vliyanie trenirovochnogo rezhima na vosstanovlenie sokratitel'noy sposobnosti myshts posle elektrostimulyatsionnogo utomleniya u myshey [Exercise regimen affects muscle contractility recovery following electrical stimulation-induced fatigue in mice]. *Mat-ly XXIII Mezhd. nauchno-prakt. konf. studentov i molodykh uchenykh "Studencheskaya meditsinskaya nauka XXI veka"* [Materials of the XXIII International Scientific and Practical Conference of Students and Young Scientists "Student Medical Science of the XXI Century"]. 2023:261–264. (In Russian)].
2. Приходько В.А., Матюзок Т.М. Резистентность к лептину приводит к изменению чувствительности к ипидакрину у мышей db/db. *Мат-лы III Межд. научно-практ. конф. «Современная фармация: новые подходы в образовании и актуальные исследования»*. 2023:231–235. [Prihod'ko V.A., Matuzok T.M. Rezistentnost' k leptinu privodit k izmeneniyu chuvstvitel'nosti k ipidakrinu u myshey db/db [Leptin resistance confers altered sensitivity to ipidacrine in db/db mice]. *Mat-ly III Mezhd. nauchno-prakt. konf. "Sovremennaya farmatsiya: novye podkhody v obrazovanii i aktual'nye issledovaniya"* [Materials of the III International Scientific and Practical Conference "Modern Pharmacy: New Approaches in Education and Current Research"]. 2023:231–235. (In Russian)].
3. Navarro K.L., Huss M., Smith J.C., Sharp P., Marx J.O., Pacharinsak C. Mouse anesthesia: The art and science. *ILAR J.* 2021;62(1–2):238–273. DOI: 10.1093/ilar/ilab016
4. Pollari E., Prior R., Robberecht W., Van Damme P., Van Den Bosch L. *In vivo* electrophysiological measurement of compound muscle action potential from the forelimbs in mouse models of motor neuron degeneration. *J. Vis. Exp.* 2018;(136):57741. DOI: 10.3791/57741
5. Schulz A., Walther C., Morrison H., Bauer R. *In vivo* electrophysiological measurements on mouse sciatic nerves. *J. Vis. Exp.* 2014;(86):51181. DOI: 10.3791/51181

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Приходько Вероника Александровна*, к.б.н., ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России, ФГБУН Институт мозга человека им. Н.П. Бехтерева РАН;
e-mail: veronika.prihodko@pharminnotech.com

Veronika A. Prihodko*, Cand. Sci. (Biol.), Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health Care of Russia, N.P. Bechtereva Institute of the Human Brain of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: veronika.prihodko@pharminnotech.com

Матузок Татьяна Максимовна, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России, ФГБУН Институт мозга человека им. Н.П. Бехтерева РАН;

e-mail: matuzok.tatyana@pharminnotech.com

Селизарова Наталья Олеговна, к.м.н., доц., ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России;

e-mail: natalia.selizarova@pharminnotech.com

Оковитый Сергей Владимирович, д.м.н., проф., ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России, ФГБУН Институт мозга человека им. Н.П. Бехтерева РАН;

e-mail: sergey.okovity@pharminnotech.com

Tatyana M. Matuzok, Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health Care of Russia, N.P. Bechtereva Institute of the Human Brain of the Russian Academy of Sciences;

e-mail: matuzok.tatyana@pharminnotech.com

Natalya O. Selizarova, Cand. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health Care of Russia;

e-mail: natalia.selizarova@pharminnotech.com

Sergey V. Okovityi, Dr. Sci. (Med.), Prof., Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health Care of Russia, N.P. Bechtereva Institute of the Human Brain of the Russian Academy of Sciences;

e-mail: sergey.okovity@pharminnotech.com

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

МОДИФИКАЦИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ КРЫС В МОДЕЛИ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ С ПОМОЩЬЮ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ КРАЙНЕ ВЫСОКОЙ ЧАСТОТЫ

М.Ю. Раваева^{1,*}, И.В. Черетаев¹, Е.Н. Чуян¹, М.В. Нагорская¹, П.А. Галенко-Ярошевский²,
А.В. Зеленская², И.С. Миронюк¹, Э.Р. Джелдубаева¹

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

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

В статье представлены результаты исследования показателей сердечно-сосудистой системы (ССС) у крыс при моделировании ишемии-реперфузии и действии электромагнитного излучения крайне высокой частоты (ЭМИ КВЧ).

Цель исследования — выявить изменения показателей сердечно-сосудистой системы крыс в условиях ишемии-реперфузии и постишемического периода при превентивном воздействии ЭМИ КВЧ. Эксперимент проводили на 30 половозрелых крысах-самцах популяции линий Wistar массой 200–220 г, которые содержались в условиях вивария с естественным свето-темновым циклом. Методом модифицированной блочной рандомизации животных разделили на 3 группы по 10 крыс в каждой: 1-я группа — ложнооперированные (ЛО), которым проводилось оперативное вмешательство в соответствии с планом операции, но без окклюзии левой общей сонной артерии (ОСА); 2-я группа — истинно оперированные (ИО), которым проводилось оперативное вмешательство, и в соответствии с планом операции производилась окклюзия левой общей сонной артерии; 3-я группа (КВЧ) подвергалась превентивному 10-кратному действию низкоинтенсивного ЭМИ КВЧ с последующим моделированием ишемии-реперфузии (на 10-е сут, спустя 60 мин после 10-го сеанса КВЧ-воздействия) и окклюзией ОСА.

Показано, что при моделировании ишемии-реперфузии головного мозга наблюдается напряжение физиологических резервов ССС и организма: происходит повышение системного АД, ЧСС, увеличение симпатических влияний на ССС, увеличение энергетических затрат и потребления кислорода кардиомиоцитами. Восстановление показателей ССС до уровня ЛО наблюдается к 3-м сут постишемического периода.

Обнаружено, что превентивное 10-кратное КВЧ-воздействие нивелирует действие ишемии, отражающееся в снижении всех показателей ССС, увеличивает адаптационные возможности организма, ускоряет восстановление в постишемическом периоде, а его физиологические резервы быстрее приспособляются к ишемическому повреждению.

Ключевые слова: сердечно-сосудистая система, ишемия-реперфузия, электромагнитное излучение крайне высокой частоты

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

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

Для цитирования: Раваева М.Ю., Черетаев И.В., Чуян Е.Н., Нагорская М.В., Галенко-Ярошевский П.А., Зеленская А.В., Миронюк И.С., Джелдубаева Э.Р. Модификация показателей сердечно-сосудистой системы крыс в модели ишемии-реперфузии с помощью электромагнитного излучения крайне высокой частоты. *Биомедицина*. 2024;20(3E):94–106. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-94-106>

Поступила 02.08.2024

Принята после доработки 24.08.2024

Опубликована 01.11.2024

MODIFICATION OF RAT CARDIOVASCULAR SYSTEM PARAMETERS IN AN ISCHEMIA-REPERFUSION MODEL USING EXTREMELY HIGH FREQUENCY ELECTROMAGNETIC RADIATION

Marina Y. Ravaeva^{1,*}, Igor V. Cheretaev¹, Elena N. Chuyan¹, Mariya V. Nagorskaya¹,
Pavel A. Galenko-Yaroshevskii², Anait V. Zelenskaya², Irina S. Mironyuk¹,
Elviza R. Dzeldubaeva¹

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

The article presents the results of studying the parameters of the cardiovascular system (CVS) in rats under conditions of ischemic-reperfusion simulation and exposure to electromagnetic radiation of extremely high frequency (EHF EMR). The aim was to identify changes in CVS parameters in rats during the post-ischemic period following preventive EHF exposure.

The experiment was carried out on 30 mature male Wistar rats weighing between 200 and 220 g, which were housed in a vivarium under a natural light-dark schedule. Using a modified block randomization method, the animals were split into three groups with 10 rats in each: group 1 included sham-operated (SO) animals, which underwent surgery according to the operation plan but without occlusion of the left carotid artery; group 2 included truly operated animals who underwent surgery and had the left common carotid occluded (CCO) in accordance with the plan; and group 3 (EHF) included animals that underwent preventive 10-fold action of low-intensity EHF EMR followed by ischemia-reperfusion modelling (on the 10th day, after 60 min after the 10th session of EHF exposure) and OCA occlusion. It is shown that the modelled ischemia-reperfusion of the brain is associated with a strain of the physiological reserves of the CVS and the body as a whole. Thus, an increase in systemic blood pressure, heart rate, sympathetic effects on the CVS, energy costs, and oxygen consumption by cardiomyocytes is observed. Recovery of CVS indicators to the level of SO is observed on the 3rd day after ischemia. It was found that preventive 10-fold exposure to EHF mitigates the effect of ischemia, which is reflected in a decrease in all CVS indicators (except for PP). This increases adaptive capabilities of the body and accelerates recovery in post-ischemia, as well as promotes faster adaptation of physiological reserves to ischemic damage.

Keywords: cardiovascular system, ischemia-reperfusion, electromagnetic radiation of extremely high frequency

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.Y., Cheretaev I.V., Chuyan E.N., Nagorskaya M.V., Galenko-Yaroshevskii P.A., Zelenskaya A.V., Mironyuk I.S., Dzeldubaeva E.R. Modification of Rat Cardiovascular System Parameters in an Ischemia-Reperfusion Model Using Extremely High Frequency Electromagnetic Radiation. *Journal Biomed.* 2024;20(3E):94–106. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-94-106>

Submitted 02.08.2024

Revised 24.08.2024

Published 01.11.2024

Введение

В наших исследованиях [11–13] показана способность низкоинтенсивного электромагнитного излучения крайне высокой частоты (ЭМИ КВЧ) изменять как сосудистые (эндотелиальные, нейрогенные и миогенные), так и внесосудистые (дыхательные и пульсовые) компоненты регуляции микроциркуляции (МЦ). Кроме этого, выраженное вазотропное действие ЭМИ КВЧ оказывает и при действии стресс-факторов разной интенсивности: при остром стрессе 10-кратное действие ЭМИ КВЧ уменьшало выраженность проявлений гиперемии, характерных для острого стресса на протяжении 48 ч после действия стресс-фактора [7], а при хроническом — нивелировало вазоконстрикцию, снижало выраженность нарушений притока и оттока крови в МЦ русле, вызванных стрессом [10, 11].

Вероятно, что и при стрессе, сопровождающем сосудистую катастрофу при моделировании ишемии-реперфузии, ЭМИ КВЧ будет оказывать вазопротекторное действие, причём не только на уровне МЦ, но и на системном уровне. Оценка работы сердечно-сосудистой системы остаётся приоритетом научных исследований в физиологии и медицине и не ограничивается измерениями артериального давления и пульса. Существует ряд индексов и коэффициентов, которые оценивают функциональные возможности жизнеобеспечивающих систем (дыхательной и сердечно-сосудистой).

Цель работы — выявить изменения показателей сердечно-сосудистой системы крыс в условиях ишемии-реперфузии и постшемического периода при превентивном воздействии ЭМИ КВЧ.

Материалы и методы

Экспериментальная часть работы выполнена на кафедре физиологии человека и животных и биофизики в Центре коллективного пользования научным оборудо-

ванием «Экспериментальная физиология и биофизика» Института биохимических технологий, экологии и фармации КФУ им. В.И. Вернадского.

Экспериментальные животные

Эксперимент проводили на 30 половозрелых крысах-самцах популяции линий Wistar массой 220–250 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 «Тосненский 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 г., 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. Для проведения отбора использовали 70 половозрелых крыс-самцов Wistar массой 180–200 г. При процедуре отбора животных в «Открытом поле» их поведение тестировали 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 скоро-

сти перемещений, временных интервалов, проведённых в состоянии полного покоя (фризинг), и в состоянии медленных и быстрых движений, груминга и числа болюсов. Таким образом, было отобрано 30 животных. Через 2 недели после отбора животных выполняли эксперимент по оценке действия 10-кратного ЭМИ КВЧ на показатели ССС.

Такой отбор позволил сформировать однородные группы животных с близкими конституционными особенностями, однонаправленно реагирующими на действие того или иного фактора, и значительно уменьшить количество животных, используемых в эксперименте.

За 1 сут до проведения эксперимента отобранных животных рандомизировали методом модифицированной блочной рандомизации. В одном блоке рандомизации использовали 6 индивидуальных клеток, в которые в случайном порядке рассаживали экспериментальных самцов крыс и присваивали им номера. Таким образом, для формирования трёх групп по 10 крыс необходимо было выполнить 5 заполнений клеток. В программе «Microsoft Office Excel 2019» с помощью генератора случайных чисел формировали 5 столбцов с номерами клеток, соответствующие процедурам заполнения. Затем делили полученную таблицу на строки. Одной группе из 10 животных соответствовало две строки из таблицы с номерами индивидуальных клеток, полученных в ходе пяти заполнений с помощью генератора случайных чисел.

После предварительного отбора животных разделили на три группы по 10 крыс в каждой. Животные первой группы — ложнооперированные (ЛО), которым проводилось оперативное вмешательство в соответствии с планом операции, но без окклюзии левой общей сонной артерии (ОСА). Животные второй группы — истинно оперированные (ИО), которым проводилось оперативное вмешательство, и в соответствии с планом операции про-

изводилась окклюзия левой общей сонной артерии. Животные третьей группы (КВЧ) подвергались превентивному 10-кратному действию низкоинтенсивного ЭМИ КВЧ с последующим (на 10-е сут, спустя 60 мин после 10-го сеанса КВЧ-воздействия) моделированием ишемии-реперфузии и, соответственно, окклюзией ОСА.

КВЧ-воздействие на животных проводилось 10-кратно, в течение 30 мин ежедневно в утреннее время путём наложения на затылочно-воротниковую область волновода аппарата КВЧ-терапии «КВЧ-НД» (рабочая длина волны — 7,1 мм, плотность потока мощности облучения — 4–6 мВт/см²; производство: ООО «Научно-коммерческая фирма РЭСЛА», Россия; Декларация соответствия № РОСС Ru. ME67.Д00227; Регистрационное удостоверение № ФСР 2007/00763 от 18.09.2007 г.).

При моделировании ишемии-реперфузии животных подвергали искусственной остановке нормального кровообращения в сосудистом русле шейных артерий, что достигалось путём пережатия левой общей сонной артерии (ОСА) с помощью металлической клипсы (ПТО «Медтехника», Россия). Хирургическое вмешательство проводилось при введении внутривенно анестетиков: Телазол 0,3 мг («Zoetis», США), Медитин 0,8 мг (ООО «АПИ-САН», Россия). Реализацию действия анестезии оценивали по ослабеванию или отсутствию ответной реакции на болевой раздражитель в виде механического повреждения тканей лапы и депрессии нормального рефлекса роговой оболочки глаза. В первый час послеоперационного периода животным вводили 0,2 мл Диклофенак («Хемофарм АД», Сербия).

Регистрация систолического артериального давления (САД, мм рт. ст.), диастолического артериального давления (ДАД, мм рт. ст.) и частоты сердечных сокращений (ЧСС, уд./мин) осуществлялась через 30 мин после наложения клипсы на ОСА — период

ишемии; через 30 мин после снятия клипсы — период реперфузии; а также на 2-е, 3-и и 7-е сут после моделирования ишемии — постишемический период.

Показатели АД и ЧСС у крыс регистрировались с помощью системы неинвазивного измерения давления у мелких лабораторных животных NIBP200A («Biorac Systems, Inc.», США). Датчик для измерения АД (мм рт. ст.) и ЧСС (уд./мин) надевался на хвост крысы. Запись и обработка данных производилась на компьютере с помощью программы «Acq Knowledge 4.2 for MP150».

Полученные результаты использовались для расчётов следующих индексов:

Вегетативный индекс Кердо вычисляли по формуле:

$$\text{ВИК} = (1 - \text{ДАД}/\text{ЧСС}) \times 100\% \quad (1),$$

где ВИК — вегетативный индекс Кердо, усл. ед.; ДАД — диастолическое артериальное давление, мм рт. ст.; ЧСС — частота сердечных сокращений, уд./мин.

Индекс Робинсона вычисляли по формуле:

$$\text{ИР} = \text{ЧСС} \times \text{САД} / 100 \quad (2),$$

где ЧСС — частота сердечных сокращений, уд./мин; САД — систолическое артериальное давление, мм рт. ст.

Коэффициент экономичности кровообращения:

$$\text{КЭК} = (\text{САД} - \text{ДАД}) \times \text{ЧСС} \quad (3),$$

где КЭК — коэффициент экономичности кровообращения, усл. ед.; САД — систолическое артериальное давление, мм рт. ст.; ДАД — диастолическое артериальное давление; ЧСС — частота сердечных сокращений, уд./мин.

Пulseвое давление:

$$\text{ПД} = \text{САД} - \text{ДАД} \quad (4),$$

где ПД — пульсовое давление, мм рт. ст., САД — систолическое артериальное давление, мм рт. ст., ДАД — диастолическое артериальное давление.

Среднее динамическое давление:

$$\text{СДД} = \text{ДАД} - \text{ПД} / 3 \quad (5),$$

где СДД — среднее динамическое давление, мм рт. ст., ДАД — диастолическое артери-

альное давление, ПД — пульсовое давление, мм рт. ст.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета «GraphPad Prizm 9.0». Поскольку распределение экспериментальных значений в группах отличалось от нормального, то оценку достоверности межгрупповых различий проводили с помощью *U*-теста Манна — Уитни. Данные представлены в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей. В описании динамики результатов использовались %, которые рассчитывались по средним арифметическим значениям соответствующих групп.

Результаты и их обсуждение

Результаты настоящего исследования показали, что моделирование ишемии приводило к изменению показателей ССС (табл. 1). Так, через 30 мин ишемии у животных группы ИО наблюдалось повышение САД на 25,6% ($p < 0,05$), ДАД — на 38,6% ($p < 0,05$), ЧСС — на 66,3% ($p < 0,05$) по отношению к таковым в группе ЛО. При реперфузии данные показатели оставались выше, чем у группы ЛО, причём САД и ДАД не достоверно, а ЧСС — на 28,3% ($p < 0,05$).

Расчёт индексов функционирования ССС показал, что при ишемии увеличилось СДД на 50,2% ($p < 0,05$), ИР — на 108,7% ($p < 0,05$), КЭК — на 57,5% ($p < 0,05$), ВИК — на 6,7% ($p < 0,05$) по сравнению с ЛО. При реперфузии данные показатели незначительно снизились, однако оставались достоверно высокими по сравнению с таковыми в группе ЛО: ИР превышал показатели в группе ЛО на 66,8% ($p < 0,05$), СДД — на 30,4% ($p < 0,05$), а КЭК — на 53,8% ($p < 0,05$).

В постишемическом периоде САД и ДАД незначительно превышали таковые в группе ЛО, а ЧСС оставалась высокой на протяжении 2-х сут (на 24%, $p < 0,05$), однако на 3-и и 7-е сут приближалась к значениям у ложнопериоперированных животных.

Из расчётных показателей только ИР достоверно увеличивался на 33,1% ($p < 0,05$) на 2-е сут постишемического периода.

Таким образом, при ишемии-реперфузии наблюдалось повышение САД, ДАД, ЧСС, СДД, ИР, ВИК, КЭК. В постишемическом периоде ЧСС и ИР превышали значения в группе ЛО на 2-е сут постишемического периода.

Известно [1], что во время оперативного вмешательства или развития ишемии головного мозга наблюдается повышение АД. Причины артериальной гипертензии в остром периоде ишемического инсульта связывают с активацией нейроэндокринных и нейрогенных механизмов регуляции АД, ишемией стволовых структур мозга, госпитальным стрессом и срывом ауторегуляции мозгового кровообращения [1]. Таким образом, гипертензия — адаптивный ответ системы кровообращения на локальную церебральную ишемию. Однако повышение системного давления линейно не связано с внутримозговой гемодинамикой. Множество факторов, таких как ауторегуляция мозгового кровотока, ишемическая ангиопатия, отёк мозга, состояние микроциркуляции, оказывают влияние на кровоснабжение тканей в области ишемического очага. Но именно АД служит наиболее доступным и легко контролируемым маркером гемодинамических нарушений в остром периоде инсульта.

СДД представляет собой давление, при котором в отсутствие пульсовых колебаний наблюдается такой же гемодинамический эффект, как и при естественном колеблющемся давлении крови. Давление в артериях во время диастолы желудочков не падает до нуля, оно поддерживается благодаря упругости артериальных стенок, растянутых во время систолы. Высокие показатели СДД на протяжении 7 сут постишемического периода свидетельствуют о неспособности организма удерживать среднее динамическое давление, что является

одним из ранних признаков нарушения деятельности аппарата кровообращения. Увеличение СДД на фоне незначительного роста АД, полученное в настоящем исследовании, свидетельствует об ослаблении функции сердечно-сосудистой системы организма.

ИР, или двойное произведение, характеризует систолическую работу сердца, являясь показателем регуляторных процессов в миокарде, и позволяет оценивать уровень обменно-энергетических процессов в миокарде и резервные возможности гемодинамики. Резкое увеличение ИР в 1-е сут на 102,2% ($p < 0,0001$) на фоне увеличения КЭК говорит о снижении аэробных возможностей миокарда, нарушениях обменных процессов в миокарде и, в целом, о нарушениях регуляции деятельности сердечно-сосудистой системы [2, 5, 8].

ИР оставался высоким на протяжении всего постишемического периода, что свидетельствует о низких резервных возможностях системы кровообращения в целом за счёт увеличения работы сердечной мышцы.

ВИК достоверно повышался в течение 30-минутной ишемии, а затем на протяжении всего времени исследования наблюдалась его стабилизация на уровне ЛО. ВИК — один из наиболее распространённых показателей функционального состояния вегетативной нервной системы, отражающий соотношение возбудимости её симпатического и парасимпатического отделов. Его повышение при ишемии свидетельствует о сдвиге в сторону доминирования симпатического компонента регуляции [4], однако при реперфузии и в постишемическом периоде наблюдалось его восстановление до уровня ЛО.

КЭК характеризует затраты организма на передвижение крови в сосудистом русле, показывает, какое количество (объём) крови выталкивается из левого желудочка во время систолы. Значительное увеличение КЭК при ишемии-реперфузии свиде-

тельствует об увеличении энергетических затрат при сокращении сердца и расходовании функциональных резервов сердечно-сосудистой системы. К 7-м сут наблюдается незначительное снижение показателей КЭК, что свидетельствует о некотором восстановлении энергетического баланса.

В целом, вышеописанные процессы приводят к аугментации САД за счёт более быстрого возвращения отражённой пульсовой волны к сердцу в связи с увеличенной жёсткостью артерий, и эта волна накладывается на систолическую фазу давления в сосуде, повышая его, что и наблюдалось в наших исследованиях.

Такое изменение гемодинамики имеет последствия — возрастает постнагрузка на левый желудочек, и повышенное САД начинает оказывать повреждающее действие в периферических органах и тканях, в первую очередь в веществе головного мозга. Поскольку сосудистая сеть головного мозга имеет низкое сопротивление, это делает его уязвимым к повышенному гидростатическому давлению крови в диастолу и создаёт предпосылки к возникновению дополнительных эпизодов ишемии и клинически может усугублять проявления ишемии. Именно такая взаимосвязь системной и церебральной гемодинамики обуславливает гипотензивную терапевтическую стратегию при развитии ишемии и делает актуальным поиск средств, способных оказывать противоишемическое действие и обладать гипотензивным эффектом.

Таким образом, при моделировании ишемии-реперфузии происходит увеличение симпатических влияний на ССС, увеличение энергетических затрат и потребления кислорода кардиомиоцитами. Частичное восстановление показателей ССС до уровня ЛО наблюдается на 3-и сут постишемического периода.

Изменение показателей сердечно-сосудистой системы крыс в условиях ишемии-реперфузии при действии ЭМИ КВЧ

При моделировании ишемии у группы крыс, получавших превентивное 10-кратное КВЧ-воздействие, наблюдалось снижение ДАД на 25,4% ($p < 0,05$), ЧСС — на 39,5% ($p < 0,05$) по сравнению с таковыми группы ИО. Во время реперфузии происходило снижение САД на 18,7% ($p < 0,05$), ДАД — на 21% ($p < 0,05$), а ЧСС — на 26,7% ($p < 0,05$) по сравнению с таковыми в группе ИО. САД на протяжении всего времени исследования были ниже таковых в группе ИО (табл. 1).

Расчёт индексов функционирования ССС у группы КВЧ показал, что СДД во время ишемии снижалось на 31,3% ($p < 0,05$), а во время реперфузии — на 23,3% ($p < 0,05$) по сравнению с группой ИО (табл. 1), ИР снижался на 50,5% ($p < 0,05$) и 40% ($p < 0,05$), а КЭК снижался на 34,8% ($p < 0,05$) и 34,9% ($p < 0,05$) по сравнению с таковыми в группе ИО.

Таким образом, превентивное 10-кратное КВЧ-воздействие у крыс во время моделирования ишемии-реперфузии приводит к изменению реакции организма на повреждение, снижая системное АД, вызывая урежение ЧСС, снижая тонус магистральных сосудов (снижение СДД), уменьшая потребление кислорода сердцем и снижая энергетические затраты организма на продвижение крови в сосудистом русле (снижение ИР и КЭК).

В постишемическом периоде (табл. 2) у крыс наблюдалось снижение АД на протяжении всего времени исследования. Так, САД на 3-и и 7-е сут снижался на 18,5% ($p < 0,05$), 10,5% ($p < 0,05$), а ДАД на 3-и сут снижался на 17,6% ($p < 0,05$), на 7-е сут — на 21% ($p < 0,05$) по отношению к таковым в группе ИО. ЧСС снижалась на 2-е сут на 16,5% ($p < 0,05$) по отношению к таковым в группе ИО.

Расчётные показатели также изменялись. Так, СДД снижалось на 2-е, 3-и и 7-е сут на 17,3% ($p < 0,05$), на 16,8% ($p < 0,05$) и на 29,2% ($p < 0,05$) соответственно по от-

Таблица 1. Показатели сердечно-сосудистой системы у крыс при ишемии-реперфузии
Table 1. Indicators of the cardiovascular system in rats with ischemia-reperfusion

Период	Группы	САД, мм рт. ст.	ДАД, мм рт. ст.	ЧСС, уд./мин	ПД, мм рт. ст.	СДД, мм рт. ст.	ВИК, усл. ед.	ИР, усл. ед.	КЭК, усл. ед.
Ишемия	«ЛО»	129,6 (123,3; 141,6)	94,18 (90,42; 95,42)	345,1 (310,2; 365,4)	38,78 (31,67; 45,96)	74,53 (69,63; 77,64)	73,50 (68,99; 74,69)	428,6 (398,6; 493,7)	11665 (10217; 15496)
	«ИО»	163,8 (160,9; 169,3) $p_n=0,0396$	126,9 (125,7; 134,9) $p_n=0,0122$	576,7 (557,4; 579,6) $p_n=0,0001$	34,59 (29,95; 43,31)	109,2 (104,3; 119,9) $p_n=0,0001$	77,41 (76,11; 78,23) $p_n=0,0032$	930,5 (922,8; 966,3) $p_n=0,0001$	19612 (16238; 24295) $p_n=0,0090$
	«КВЧ»	141,9 (115,7; 149,8)	94,91 (90,50; 101,5) $p_n=0,0003$	323,6 (298,5; 409,7) $p_n=0,0001$	42,98 (20,65; 51,60)	81,34 (63,58; 85,18) $p_n=0,0003$	70,75 (66,02; 77,42)	466,6 (384,2; 512,2) $p_n=0,0001$	13258 (8525; 18367) $p_n=0,0136$
Реперфузия	«ЛО»	127,1 (122,9; 131,6)	89,65 (85,05; 93,84)	329,1 (310,2; 347,8)	38,10 (28,07; 44,37)	75,60 (62,71; 78,68)	72,00 (71,05; 74,22)	397,4 (391,7; 442,4)	11119 (9395; 13885)
	«ИО»	154,2 (150,8; 159,6)	115,1 (110,1; 116,3)	426,0 (425,0; 471,3) $p_n=0,0054$	42,74 (36,12; 47,59)	94,79 (87,05; 96,86) $p_n=0,0177$	73,07 (72,66; 76,48)	684,3 (648,8; 711,8) $p_n=0,0050$	18784 (15425; 21522) $p_n=0,0068$
	«КВЧ»	125,5 (125,0; 126,7) $p_n=0,0001$	85,48; 93,33 $p_n=0,0002$	343,2 (328,9; 365,7) $p_n=0,0189$	37,04 (32,09; 39,90)	69,01 (65,87; 77,29) $p_n=0,0019$ $p_n=0,0073$	75,08 (72,17; 76,52)	430,1 (411,2; 460,8) $p_n=0,0054$	12910 (10765; 14491) $p_n=0,0295$

Примечание: (здесь и в табл. 2) САД — систолическое артериальное давление; ДАД — диастолическое артериальное давление; ЧСС — частота сердечных сокращений; ПД — пульсовое давление; СДД — среднее динамическое давление; ВИК — вегетативный индекс Кердо; ИР — индекс Робинсона; КЭК — коэффициент экономичности кровообращения. Указаны медиана (25-й; 75-й квартиль), p_n и p_n — достоверные различия по сравнению с ЛО и ИО соответственно.
Note: (here and in Table 2) САД — systolic blood pressure; ДАД — diastolic blood pressure; ЧСС — heart rate; ПД — pulse pressure; СДД — average dynamic pressure; ВИК — vegetative index of Kerdo; ИР — Robinson index; КЭК — coefficient of efficiency of blood circulation. The median (25th; 75th quartiles) are indicated. p_n and p_n — significant differences compared to LO and IO, respectively.

Таблица 2. Показатели сердечно-сосудистой системы у крыс в постischemическом периоде
Table 2. Indicators of the cardiovascular system in rats after ischemia

Период	Группы	САД, мм рт. ст.	ДАД, мм рт. ст.	ЧСС, уд./мин	ПД, мм рт. ст.	СДД, мм рт. ст.	ВИК, усл. ед.	ИР, усл. ед.	КЭК, усл. ед.
2-е сут	«ЛО»	128,1 (125,4; 130,1)	88,16 (85,33; 91,37)	322,5 (310,2; 337,2)	38,42 (36,00; 42,54)	69,44 (64,27; 75,10)	73,15 (70,48; 74,56)	416,8 (395,2; 429,4)	12712 (10763; 13985)
	«ИО»	141,9 (115,7; 149,8)	106,7 (95,09; 110,9)	402,3 (379,6; 423,2) $p_n=0,0003$	30,97 (20,65; 41,13)	86,55 (84,79; 95,83)	73,08 (72,10; 75,30)	556,4 (460,0; 615,5) $p_n=0,0027$	12077 (8335; 16270)
	«КВЧ»	115,7 (112,8; 117,5)	87,84 (86,13; 89,11) $p_n=0,0001$	333,6 (325,3; 339,3) $p_n=0,0167$	28,14 (26,09; 30,15) $p_n=0,0001$	72,90 (71,73; 74,77) $p_n=0,0001$	73,67 (72,91; 74,62)	386,8 (371,4; 394,3) $p_n=0,0001$	9767 (8598; 10020) $p_n=0,0084$
3-и сут	«ЛО»	125,6 (123,5; 128,6)	89,13 (85,49; 92,41)	329,1 (310,2; 340,9)	37,41 (31,19; 41,54)	69,67 (64,95; 75,96)	73,30 (70,91; 74,53)	406,6 (395,2; 424,5)	12730 (9931; 13628)
	«ИО»	145,6 (121,8; 150,2)	97,41 (93,38; 102,4)	341,8 (265,7; 410,2)	46,22 (23,80; 52,48)	80,93 (67,25; 84,95)	69,29 (64,69; 76,48)	520,4 (375,4; 544,4)	13029 (9860; 16590)
	«КВЧ»	111,3 (110,2; 116,3) $p_n=0,0002$	79,04 (76,61; 84,89) $p_n=0,0001$	325,5 (324,1; 328,7)	32,70 (26,83; 38,55)	60,52 (58,11; 71,30) $p_n=0,0056$	74,87 (73,98; 76,43) $p_n=0,0274$	363,3 (356,5; 380,0)	10617 (8715; 12098) $p_n=0,0003$
7-е сут	«ЛО»	127,1 (124,3; 129,4)	88,65 (86,34; 94,92)	322,2 (318,8; 340,2)	38,42 (31,33; 40,25)	69,46 (66,21; 79,25)	72,03 (70,46; 74,62)	416,4 (395,1; 436,5)	12662 (10074; 13667)
	«ИО»	133,6 (125,4; 135,7)	98,56 (95,53; 104,4)	344,0 (329,1; 345,3)	32,25 (19,91; 39,90)	81,99 (75,90; 94,47)	71,39 (68,87; 71,85)	441,7 (420,1; 466,2)	10818 (6699; 13663)
	«КВЧ»	119,8 (111,6; 123,0) $p_n=0,0005$	77,68 (73,23; 83,93) $p_n=0,0001$	271,7 (234,6; 367,5)	38,71 (27,76; 49,87)	60,57 (49,62; 70,11) $p_n=0,0008$	70,76 (65,63; 78,45)	308,8 (284,0; 447,7) $p_n=0,0080$ $p_n=0,0133$	11138 (7451; 16053)

ношению к таковым в группе ИО. ИР также снижался на 29,3% ($p<0,05$) и на 20% ($p<0,05$) на 2-е и 7-е сут соответственно по отношению к таковым в группе ИО. ВИК увеличился на 7,4% ($p<0,05$), а снизился на 3-и сут на 20,5% ($p<0,05$) по отношению к таковым в группе ИО.

Таким образом, в постишемическом периоде крысы, которым превентивно оказывалось КВЧ-воздействие, демонстрировали более высокие функциональные возможности жизнеобеспечивающей системы — сердечно-сосудистой системы по сравнению с животными с моделированной ишемией.

Снижение САД, ДАД, ЧСС свидетельствует об уменьшении АД, подъём которого всегда сопровождает развитие сосудистых катастроф, таких как ишемия головного мозга. Снижение ИР и СДД отражают восстановление энергетического потенциала организма, уменьшение потребления кислорода сердечной мышцей и усиление функции сердечно-сосудистой системы. Снижение ИР на фоне изменения ВИК и КЭК может свидетельствовать о нормализации не только обменных процессов в кардиомиоцитах, но и иннервации сердечной мышцы, что может проявляться в нормализации её проводимости и, как следствие, увеличении сердечного выброса и снижении ЧСС.

Таким образом, превентивное КВЧ-воздействие нивелировало действие ишемии, что отражалось в снижении всех показателей ССС.

В пользу этого свидетельствуют и результаты сравнительного анализа показателей у животных в группе ЛО и КВЧ. Так, анализ показал отсутствие статистической значимости различий показателей САД, ДАД и ЧСС на протяжении как моделирования ишемии-реперфузии, так и в постишемическом периоде. При этом, на 2-е сут происходит снижение ПД на 29,1% ($p<0,05$) по сравнению с ЛО, что свидетельствует

об увеличении эластических свойств магистральных артерий (прежде всего, корня и восходящего отдела аорты) и улучшении функции эндотелия [6], а также снижение КЭК (на 2-е сут на 26,1%, $p<0,05$) и ИР (на 7-е сут, 15,1%, $p<0,05$), что отражает снижение энергетических затрат и потребления кислорода миокардом, т. е. развивается адаптивная реакция, ведущая к повышению устойчивости к гипоксии и стабилизации уровня энергообеспечения при ишемических повреждениях [3].

В целом, уровни ПД, КЭК и ИР указывают на высокие функциональные возможности сердечно-сосудистой системы животных группы КВЧ не только по сравнению с животными, подвергнутыми ишемии-реперфузии, но и ложнооперированными, без ишемии. Возможно, это обусловлено нормализацией регуляторных систем, под контролем которых находится ССС, таких как гуморальная регуляция и центральная и вегетативная нервная система, и, соответственно, развитием неспецифической резистентности, которая лимитирует развитие стресс-реакции на ишемическое повреждение. Действительно, наши предыдущие исследования показали [9], что при действии ЭМИ КВЧ на интактных животных, а также крыс, подвергнутых действию стресса «иммунной» и «не иммунной» природы, выявлены существенные изменения, происходящие во всех звеньях нейроиммуноэндокринной системы. Эти изменения способствуют подавлению чрезмерной активности симпатно-адреналовой системы, одного из важнейших звеньев стресс-реализующей системы и активизации стресс-лимитирующих систем, увеличению иммунореактивности, неспецифической резистентности, антиоксидантных свойств организма, возникновению Р-эффекта нейтрофилов и лимфоцитов, нормализации системы гемостаза, коррекции поведенческих нарушений и десинхронозов, увеличе-

нию функциональной асимметрии нервной, иммунной и эндокринной систем.

Полученные результаты убедительно свидетельствуют о развитии в организме животных под влиянием КВЧ-излучения устойчивой, обладающей защитными эффектами к последующим повреждающим стресс-факторам адаптации. Явление защитных эффектов перекрёстной адаптации к ЭМИ КВЧ открывает перспективу применения этого физического фактора при лечении ишемии у человека и возможность практического использования низкоинтенсивного ЭМИ КВЧ в качестве способа повышения естественной (физиологической) резистентности организма к воздействию ишемии, представляющего собой профилактический подход к защите пациента при заболеваниях сердечно-сосудистой системы, например, при ишемических поражениях головного мозга.

Выводы

1. При моделировании ишемии-реперфузии головного мозга наблюдалось напряжение физиологических резервов сердечно-сосудистой системы и организма в целом: повышение системного артериального давления, частоты сердечных сокращений, увеличение симпатических влияний на сердечно-сосудистую систему, увеличение энергетических затрат и потребления кислорода кардиомиоцитами. Восстановление показателей ССС до уровня ЛО происходило к 3-м сут постишемического периода.

2. Превентивное 10-кратное КВЧ-воздействие нивелировало действие ишемии, что отражалось в модификации всех показателей сердечно-сосудистой системы, увеличении адаптационных резервов организма и ускорении восстановления в постишемическом периоде.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Благоднаров М.Л., Азова М.М., Фролов В.А., Горячев В.А. Особенности циркадианной динамики АД и ЧСС у спонтанно-гипертензивных крыс. *Вестник РУДН. Серия: Медицина*. 2012;7:47–49. [Blagodaravov M.L., Azova M.M., Frolov V.A., Goryachev V.A. Osobennosti tsirkadiannoy dinamiki AD i ChSS u spontanno-gipertenzivnykh krys [Characteristics of BP and HR circadian dynamics in spontaneously hypertensive rats]. *Vestnik RUDN. Seriya: Meditsina* [RUDN Journal of Medicine]. 2012;7:47–49. (In Russian)].
2. Боярская Л.А., Прокопьева Н.Я., Ананьев В.Н., Августа Е.Н. Изучение хронобиологических показателей индекса Робинсона у женщин с ишемической болезнью сердца в условиях гиподинамии, перенёсших новую коронавирусную инфекцию. *Современные вопросы биомедицины*. 2022;6(2):162–170. [Boyarskaya L.A., Prokop'eva N.Ya., Anan'ev V.N., Avgusta E.N. Izuchenie khronobiologicheskikh pokazateley indeksa Robinsona u zhenshchin s ishemicheskoy bolezn'yu serdtsa v usloviyakh gipodinamii, pereneshikh novuyu koronavirusnuyu infektsiyu [The study of chronobiological indicators of the Robinson index in women with coronary heart disease in conditions of inactivity who have suffered a new coronavirus infection]. *Sovremennye voprosy biomeditsiny* [Modern Issues of Biomedicine]. 2022;6(2):162–170. (In Russian)]. DOI: 10.51871/2588-0500-2022-06-02-21
3. Зарубина И.В., Шабанов П.Д. От идеи С.П. Боткина о «предвоздействии» до феномена прекондиционирования. Перспективы применения феноменов ишемического и фармакологического прекондиционирования. *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. 2016;1:4–28. [Zarubina I.V., Shabanov P.D. Ot idei S.P. Botkina o «predvozdeystvii» do fenomena prekonditsionirovaniya. Perspektivy primeneniya fenomenov ishemicheskogo i farmakologicheskogo prekonditsionirovaniya [From S.P. Botkin's idea of “pre-action” to the phenomenon of preconditioning. Prospects for the application of the phenomena of ischemic and pharmacological preconditioning]. *Obzory po klinicheskoy farmakologii i lekarstvennoy terapii* [Reviews in Clinical Pharmacology and Drug Therapy]. 2016;1:4–28. (In Russian)].
4. Иванова Н.Е. Динамика индекса Кердо в комплексном лечении пациентов с хронической ишемией головного мозга. *Мануальная терапия*. 2011;1:33–37. [Ivanova N.E. Dinamika indeksa Kerdo v kompleksnom lechenii patsientov s khronicheskoy ishemiey golovnogo mozga [Kerdo index dynamics in the complex treatment of patients with chronic cerebral ischemia]. *Manual'naya terapiya* [Manual therapy]. 2011;1:33–37. (In Russian)].
5. Колокольцев М.М., Носов А.В. Характеристика индекса Робинсона у студентов различных функциональных групп и уровней физического здоровья.

- вья. *Физическая культура и спорт в структуре профессионального образования: ретроспектива, реальность и будущее. Материалы межведомственного круглого стола. Посвящается 300-летию российской полиции*. Иркутск, 2018:102–107. [Kolokol'cev M.M., Nosov A.V. Kharakteristika indeksa Robinsona u studentov razlichnykh funktsional'nykh grupp i urovney fizicheskogo zdorov'ya [Characteristics of the Robinson index among students of various functional groups and levels of physical health]. *Fizicheskaya kul'tura i sport v strukture professional'nogo obrazovaniya: retrospektiva, real'nost' i budushchee. Materialy mezhdovedstvennogo kruglogo stola. Posvyashchaetsya 300-letiyu rossiyskoy politzii* [Physical culture and sport in the structure of vocational education: retrospective, reality and future. Materials of the inter-departmental roundtable. Dedicated to the 300th anniversary of the Russian police]. Irkutsk, 2018:102–107. (In Russian)].
6. Остроумова О.Д., Кочетков А.И., Остроумова Т.М. Пульсовое артериальное давление и когнитивные нарушения. *Российский кардиологический журнал*. 2021;26(1):4317. [Ostroumova O.D., Kochetkov A.I., Ostroumova T.M. Pul'sovoe arterial'noe davlenie i kognitivnye narusheniya [Pulse pressure and cognitive impairment]. *Rossiyskiy kardiologicheskii zhurnal* [Russian Journal of Cardiology]. 2021;26(1):4317. (In Russian)]. DOI: 10.15829/1560-4071-2021-4317
 7. Раваева М.Ю., Чуян Е.Н., Пивоварчук А.В., Колесник В.В. Тканевая микрогемодинамика животных в условиях острого стресса. *Учёные записки Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского. Биология. Химия*. 2018;4(3):151–162. [Ravaeva M.Yu., Chuyan E.N., Pivovarchuk A.V., Kolesnik V.V. Tkanevaya mikrogemodinamika zhiivotnykh v usloviyakh ostrogo stressa [Tissue microhemodynamics animals in conditions of acute stress]. *Uchenye zapiski Krymskogo federal'nogo universiteta imeni V.I. Vernadskogo. Biologiya. Khimiya* [Scientific Notes of V.I. Vernadsky Crimean Federal University. Biology. Chemistry]. 2018;4(3):151–162. (In Russian)].
 8. Семизоров Е.А., Прокопьев Н.Я., Губин Д.Г. Индекс Робинсона у юношей профильных вузов г. Тюмени. *Современный учёный*. 2019;4:155–160. [Semizorov E.A., Prokopiev N.Ya., Gubin D.G. Indeks Robinsona u yunoshey profil'nykh vuzov g. Tyumeni [Robinson index at young men of Tyumen profile universities]. *Sovremennyy uchenyy* [A Modern Scientist]. 2019;4:155–160. (In Russian)].
 9. Чуян Е.Н., Джелдубаева Э.Р. Низкоинтенсивное миллиметровое излучение: нейроиммуноэндокринные механизмы адаптационных реакций. ООО «Издательство Типография «Ариал», 2020. [Chuyan E.N., Dzheldubayeva E.R. Nizkointensivnoe millimetrovye izlucheniye: neyroimmunoendokrinnye mekhanizmy adaptatsionnykh reaktsiy [Low-intensity millimeter radiation: neuroimmunoendocrine mechanisms of adaptive reactions]. Simferopol: ООО «Izdatelstvo Tipografiya «Ariyal» Publ., 2020. (In Russian)].
 10. Чуян Е.Н., Раваева М.Ю. Влияние хронического гипокинетического стресса на тканевую микрогемодинамику. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2015;101(3):316–325. [Chuyan E.N., Ravaeva M.Yu. Vliyanie khronicheskogo gipokineticheskogo stressa na tkanevuyu mikrogemodinamiku [Effects of chronic hypokinetic stress on microhemodynamics of tissue]. *Rossiyskiy fiziologicheskii zhurnal im. I.M. Sechenova* [Russian Journal of Physiology]. 2015;101(3):316–325. (In Russian)].
 11. Чуян Е.Н., Раваева М.Ю. Механизмы вазопротекторного действия электромагнитного излучения крайне высокой частоты в условиях хронического гипокинетического стресса. *Биомедицинская радиоэлектроника*. 2017;3:55–65. [Chuyan E.N., Ravaeva M.Yu. Mekhanizmy vazoprotektornogo deystviya elektromagnitnogo izlucheniya kryayne vysokoy chastoty v usloviyakh khronicheskogo gipokineticheskogo stressa [Mechanisms of vasoprotective action of extremely high frequency electromagnetic radiation in conditions of chronic hypokinetic stress]. *Biomeditsinskaya radioelektronika* [Biomedical Radio Electronics]. 2017;3:55–65. (In Russian)].
 12. Чуян Е.Н., Раваева М.Ю., Миرونюк И.С., Джелдубаева Э.Р., Черетаев И.В., Ливенцов С.Ю. Механизмы влияния низкоинтенсивного электромагнитного излучения миллиметрового диапазона на тканевую микрогемодинамику. *Технологии живых систем*. 2024;21(1):29–45. [Chuyan E.N., Ravaeva M.Yu., Mironyuk I.S., Dzheldubayeva E.R., Cheretaev I.V., Liventsov S.Yu. Mekhanizmy vliyaniya nizkointensivnogo elektromagnitnogo izlucheniya millimetrovogo diapazona na tkanevuyu mikrogemodinamiku [Tissue microhemodynamics: mechanisms of influence of low-intensity electromagnetic radiation of the millimeter range]. *Tekhnologii zhivyykh system* [Technologies of Living Systems]. 2024;21(1):29–45. (In Russian)]. DOI: 10.18127/j20700997-202401-03
 13. 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. [Chuyan E.N., Tribat N.S., Ravaeva M.Yu., Ananchenko M.N. Tkanevaya mikrogemodinamika: vliyanie nizkointensivnogo elektromagnitnogo izlucheniya millimetrovogo diapazona [Tissue microhemodynamics: the effect of low-intensity electromagnetic radiation in the millimeter range]. Simferopol: ООО «Izdatelstvo Tipografiya «Ariyal» Publ., 2017. (In Russian)].

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Раваева Марина Юрьевна*, к.б.н., доц.,
ФГАОУ ВО «Крымский федеральный универси-
тет 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 универси-
тет им. В.И. Вернадского»;
e-mail: cheretaev86@yandex.ru

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

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

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

Нагорская Мария Викторовна, ФГАОУ ВО
«Крымский федеральный университет
им. В.И. Вернадского»;
e-mail: zaygolnikova@mail.ru

Mariya V. Nagorskaya, V.I. Vernadsky Crimean
Federal University;
e-mail: zaygolnikova@mail.ru

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

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

Зеленская Анаит Владимировна, к.м.н., доц.,
ФГБОУ ВО «Кубанский государственный меди-
цинский университет» Минздрава России;
e-mail: anait_06@mail.ru

Anait V. Zelenskaya, Cand. Sci. (Med.),
Assoc. Prof., Kuban State Medical University
of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: anait_06@mail.ru

Миронюк Ирина Сергеевна, к.б.н., ФГАОУ ВО
«Крымский федеральный университет
им. В.И. Вернадского»;
e-mail: i.mironyuk92@mail.ru

Irina S. Mironyuk, Cand. Sci. (Biol.), Assoc. Prof.,
V.I. Vernadsky Crimean Federal University;
e-mail: i.mironyuk92@mail.ru

Джелдубаева Эльвиза Рашидовна, к.б.н., доц.,
ФГАОУ ВО «Крымский федеральный универ-
ситет им. В.И. Вернадского»;
e-mail: delviza@mail.ru

Elviza R. Dzeldubaeva, Cand. Sci. (Biol.), Assoc.
Prof., V.I. Vernadsky Crimean Federal University;
e-mail: delviza@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЯ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО МЕТАБОЛИЗМА В ТКАНЯХ ПРОГНОЗИРУЕТ ТЯЖЕСТЬ НАРУШЕНИЯ В СИСТЕМЕ КЛЕТОК КРОВИ И КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА У МЫШЕЙ С МОДЕЛЬЮ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2-ГО ТИПА

О.И. Степанова^{1,*}, Р.А. Клёсов¹, Х.Х. Семёнов¹, И.Б. Алчинова², А.Б. Черепов²,
А.А. Метёлкин², М.Ю. Карганов², А.О. Никольская³, Н.А. Онищенко³, Ю.Б. Басок³

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

² ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»
125315, Российская Федерация, Москва, ул. Балтийская, 8

³ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии
и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова» Минздрава России
123182, Российская Федерация, Москва, ул. Щукинская, 1

При прогрессирующем развитии сахарного диабета 2-го типа (СД2) у мышей db/db выявлено три стадии нарушения метаболизма углеводов и окислительно-восстановительных процессов (ОВП). Установлено, что уже в I стадии у мышей db/db снижалось содержание эритроцитов, гемоглобина и лейкоцитов. Во II и особенно в III стадиях происходило повышение тромбоцитов, %-содержания нейтрофилов, моноцитов, эозинофилов и снижение лимфоцитов. В костном мозге у мышей db/db уже в I, но особенно в III стадии определялось снижение доли живых и повышение количества повреждённых клеток, преимущественно за счёт апонекротических клеток. Таким образом, по мере прогрессирования СД2 и выраженного снижения эффективности ОВП, особенно на III стадии, в организме тормозятся процессы кроветворения и усиливаются нарушения в соотношении клеточных популяций нейтрофилов/лимфоциты, что свидетельствует о развитии тяжёлой гипоксии, активации системной воспалительной реакции и торможении репаративных процессов, создающих условия для развития опасных осложнений.

Ключевые слова: сахарный диабет, окислительно-восстановительные процессы, клетки крови и костного мозга

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: работа частично выполнена в рамках государственного задания по теме: «Оценка адаптивных реакций организма на действие физико-химических и экологических факторов среды» (№ FGUF-2022-0010).

Для цитирования: Степанова О.И., Клёсов Р.А., Семёнов Х.Х., Алчинова И.Б., Черепов А.Б., Метёлкин А.А., Карганов М.Ю., Никольская А.О., Онищенко Н.А., Басок Ю.Б. Динамика изменения окислительного метаболизма в тканях прогнозирует тяжесть нарушения в системе клеток крови и клеток костного мозга у мышей с моделью сахарного диабета 2-го типа. *Биомедицина*. 2024;20(3E):107–112. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-107-112>

Поступила 27.03.2024

Принята после доработки 23.08.2024

Опубликована 01.11.2024

CHANGES IN TISSUE OXIDATIVE METABOLISM PREDICT THE SEVERITY OF DISORDERS IN THE SYSTEM OF BLOOD AND BONE MARROW CELLS IN A MOUSE MODEL OF TYPE 2 DIABETES MELLITUS

Olga I. Stepanova^{1,*}, Roman A. Klesov¹, Khyzyr Kh. Semenov¹, Irina B. Alchinova²,
Anton B. Cherepov², Arkady A. Metelkin², Mikhail Yu. Karganov², Alla O. Nikolskaya³,
Nina A. Onishchenko³, Yulia B. Basok³

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 Research Institute of General Pathology and Pathophysiology
125315, Russian Federation, Moscow, Baltiyskaya Str., 8

³ Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs
of the Ministry of Health Care of Russia
123182, Russian Federation, Moscow, Shchukinskaya Str., 1

The progressive development of diabetes mellitus (DM2) in db/db mice is associated with three stages of impaired carbohydrate metabolism and redox processes. In db/db mice, the content of erythrocytes, hemoglobin, and leukocytes was found to decrease already in stage I of DM2. In the II and, in particular, III stages, an increase in platelets, percentage of neutrophils, monocytes, and eosinophils was observed, along with a decrease in lymphocytes. In the bone marrow of db/db mice, a decrease in the proportion of living cells and an increase in the number of damaged cells were determined already in stage I, but especially in stage III, mainly due to aponecrotic cells. Therefore, along with the progression of DM2 and a marked decrease in the effectiveness of redox processes, particularly in stage III, hematopoiesis processes are inhibited and disturbances in the ratio of neutrophil/lymphocyte cell populations increase. This indicates the development of severe hypoxia, activation of a systemic inflammatory reaction, and inhibition of reparative processes that create conditions for the development of dangerous complications.

Keywords: diabetes mellitus, redox processes, blood and bone marrow cells

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

Funding: the work was partially completed within the framework of the state assignment on the topic: "Assessment of the body's adaptive responses to the action of physicochemical and environmental factors" (No. FGFU-2022-0010).

For citation: Stepanova O.I., Klesov R.A., Semenov Kh.Kh., Alchinova I.B., Cherepov A.B., Metelkin A.A., Karganov M.Yu., Nikolskaya A.O., Onishchenko N.A., Basok Yu.B. Changes in Tissue Oxidative Metabolism Predict the Severity of Disorders in the System of Blood and Bone Marrow Cells in a Mouse Model of Type 2 Diabetes Mellitus. *Journal Biomed.* 2024;20(3E):107–112. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-107-112>

Submitted 27.03.2024

Revised 23.08.2024

Published 01.11.2024

Введение

Сахарный диабет 2-го типа (СД2) представляет собой хроническое мультифакторное заболевание, ранним клиническим проявлением которого является постепенно прогрессирующая гипергликемия. Проблема взаимовлияния при СД2 гипер-

гликемии, окислительного метаболизма в тканях и состояния клеток крови и костного мозга (КМ) остаётся недостаточно изученной.

Цель работы — изучить влияние прогрессирующих нарушений углеводного

и окислительного метаболизма в тканях на динамику изменения состояния клеток крови и КМ у мышей с СД2.

Материалы и методы

Динамику нарушений метаболизма в тканях организма и состояния клеток крови и КМ при СД2 изучали на гомозиготных мышах C57BL/KsJYLepr^{db/+} (B/Ks-Lepr^{db/+}) – (db/db) (n=40). Контролем служили фенотипически здоровые гетерозиготные мыши той же линии (B/Ks-Lepr^{db/+}) – (db/+m) (n=16). В динамике измеряли содержание глюкозы в крови, гликозилированного гемоглобина (HbA1c%) в эритроцитах и массу тела, а также проводилась оценка состояния окислительно-восстановительных процессов (ОВП) в тканях организма, неинвазивно с помощью аппарата ЛАЗМА-СТ (Россия), который измеряет микроциркуляцию крови и лимфы в тканях хвоста, определяли уровень активности митохондриальных коферментов — НАДН, ФАД и показатель окислительного метаболизма (ПОМ) [1]. Для исследования клеток крови забирали её в пробирки с K₃ЭДТА, а оценку гематологических показателей проводили на автоматическом гематологическом анализаторе DYMIND VET DF50 (Китай). Данные представляли как средний результат из трёх промеров.

Клетки костного мозга (ККМ) выделяли у мышей с использованием стандартного протокола [2]. Для оценки выраженности апоптоза ККМ использовали детекцию фосфатидилсерина на внешней мембране клеток с помощью меченого аннексина V. Количество аннексин-положительных клеток оценивали по стандартному протоколу с последующей проточной цитометрией [3]. Для определения целостности клеточной мембраны использовали йодистый пропилий. Образцы анализировали на проточном цитометре BD FACSCalibur («Becton Dickson», США), для каждого образца накапливалось от 15 000 до 25 000 событий.

Анализ результатов проводили с учётом рекомендаций, изложенных в работе [3], но не без установки таргетного гейта.

Результаты и их обсуждение

Измерение показателей — глюкозы и HbA1c — выявило, что нарушение углеводного обмена прогрессирует и отличается от показателей контрольной группы (db/+m). Сравнение возрастных изменений выявило, что у мышей db/db быстро развивалось ожирение, типичное при СД2. Однако начиная с 5–6 до 8 мес. у мышей db/db развивалась быстрая потеря веса, при этом уровень глюкозы и HbA1c в крови продолжал увеличиваться. У мышей db/db наблюдались клинические признаки, такие как полидипсия, полифагия и полиурия, которые были выраженными со 2-го мес. после рождения. При динамическом измерении микроциркуляторно-тканевых показателей, характеризующих состояние ОВП, у мышей db/db и мышей db/+m было установлено, что на сроке жизни 1,5 мес. амплитуды концентрации коферментов НАДН, ФАД и ПОМ выявленные различия показателей состояния ОВП при сравнении с контролями были недостоверны. Эта I стадия развития СД2 была названа периодом адаптации.

Формирование у мышей db/db первых клинических признаков дезадаптации обнаруживается в возрасте 2,0–2,5 мес., когда констатируется значительное повышение веса, уровня гликемии (до 18,70±3,83 ммоль/л) и появление полиурии. На этом сроке показатели микроциркуляции снижаются, а амплитуды коферментов достоверно повышаются (НАДН=1,16±0,47; ФАД=1,51±0,44) и достоверно понижается ПОМ (6,26±2,36), что указывает на снижение ОВП в организме и развитие тканевой гипоксии. С возрастом у животных до 4,5 мес. продолжает повышаться уровень глюкозы в крови и HbA1c (глюкозотоксичность), нарастают полиурия и полифагия, прогрессирует тяжесть нару-

шения физиологических функций и ОВП в организме, но ещё не проявляются осложнения. Эта II стадия была названа стадией прогрессирующей дезадаптации. В возрасте 5,0–6,5–8 мес. у мышей db/db гипергликемия достигает $27,40 \pm 2,09$ ммоль/л (норма — $5,70 \pm 0,65$ ммоль/л; $p < 0,05$), HbA1c — $8,9 \pm 1,25\%$ (норма — $3,9 \pm 0,57\%$; $p < 0,05$); отмечаются высокие уровни коферментов: НАДН = $1,42 \pm 0,75$ (норма — $0,65 \pm 0,01$; $p < 0,05$), ФАД = $1,51 \pm 0,33$ (норма — $0,97 \pm 0,02$; $p < 0,05$) и крайне низкий уровень ПОМ = $3,97 \pm 1,39$ (норма — $10,91 \pm 2,04$; $p < 0,05$). На этом же сроке у 30% животных в состоянии крайней степени тяжести возникала мацерация кожи (в области холки), которая становилась обширной незаживающей раной и оставалась у животного вплоть до его гибели. На этом сроке аппаратом ЛАЗМА-СТ было выявлено появление пиков пигмента липофусцина у 40% животных и пиков пигмента порфирина у 5% животных, которые являются маркерами развивающейся в организме декомпенсации, что позволило нам признать описанное состояние на сроке с 5,0–6,5 до 8 мес. III стадией развития СД2 — стадией декомпенсации.

Выявив три стадии метаболических нарушений при СД2, приступили к изучению состояния клеток крови и КМ в эти периоды. Получены результаты исследования состояния эритроцитов и тромбоцитов у мышей db/+m (контроль) и у мышей db/db на разных стадиях прогрессирования СД2. На ранних сроках жизни мышей db/db (1,5–2,0 мес. — стадия адаптации) в их крови отмечается низкое содержание эритроцитов и сниженное содержание в эритроцитах гемоглобина по сравнению с контролем db/+m. Повышение эритроцитов на стадии декомпенсации является следствием сгущения крови на фоне развившейся полиурии. На раннем сроке жизни мышей db/db наметилась тенденция к повышению среднего объёма эритроцита, ширины распределе-

ния эритроцитов (стандартное отклонение) и тромбоцитов, а также к снижению средней концентрации гемоглобина в эритроците. Эта тенденция сохранялась на этапах дезадаптации и декомпенсации, которые свидетельствуют о развивающихся структурных изменениях эритроцитов.

При исследовании тромбоцитов выявлено резкое увеличение количества этих клеток в крови на этапе декомпенсации ОВП и метаболизма у мышей db/db. При исследовании содержания лейкоцитов в крови было выявлено более низкое содержание общего количества лейкоцитов на ранних сроках жизни мышей db/db (1,5–2,0 мес.) по сравнению с контролем — $5,22 \times 10^9$ /л против $9,92 \times 10^9$ /л. С возрастом мышей db/db снижение содержания клеток белой крови прогрессировало, на фоне происходящего повышения процентного содержания нейтрофилов, моноцитов и эозинофилов, а также снижения лимфоцитов. Эти изменения усиливались при декомпенсации. Повышение содержания тромбоцитов, нейтрофилов, моноцитов и эозинофилов на фоне прогрессирующего снижения содержания лимфоцитов, и повышение отношения процентного содержания нейтрофилов к лимфоцитам свидетельствуют об усиливающейся активации при СД2 системной воспалительной реакции и торможении репаративных процессов, создающих условия для развития микро- и макрососудистых осложнений.

Выявленные изменения в крови побудили нас изучить у мышей db/db состояние КМ, осуществляющего процессы кроветворения в организме. Цитометрическое исследование состояния ККМ показало картину распределения: живых ~66,1% и гибнущих ККМ ~33,85% мышей на I стадии СД2, которая не отличается от контрольных мышей db/+m. На II стадии развития СД2 у мышей db/db происходит заметное увеличение доли клеток меченных аннексином V AF488 ~20,3%, т. е. начинает преобладать апопто-

тический путь гибели ККМ. Массированная гибель ККМ у мышей db/db с СД2 наблюдается в III стадии: клеточная гибель скорее идёт по апонекротическому пути, т. к. пул клеток, окрашенных аннексином V AF488 и иодидом пропидия, составляет ~44,4% от общего количества. При этом пул неповреждённых клеток составляет менее ~30,6%, и пул клеток, которые составляют объёмную некротическую популяцию, детектируемую цитометром, — ~17,2%. При прогрессировании метаболических нарушений и снижении эффективности ОВП в костном мозге также неуклонно нарастает угнетение процессов кроветворения, постепенно формирующих в организме различные осложнения и состояние необратимости.

Выводы

1. Прогрессирующее развитие СД2 проследится на фоне усиливающейся гликемии, увеличения содержания гликозилированного гемоглобина в эритроцитах, повышения массы тела на I и II стадии и снижения массы тела на III стадии. Эти изменения кли-

нических показателей происходят на фоне постепенного снижения эффективности показателей ОВП (повышение амплитуд коферментов НАДН, ФАД и снижение ПОМ), особенно выраженном на III стадии.

2. При пилотном исследовании состояния клеток крови у мышей с СД2 уже на I стадии отмечается снижение содержания эритроцитов, гемоглобина и лейкоцитов, которое сохраняется на II и III стадии. На II и особенно на III стадии наступает резкое повышение количества тромбоцитов и процентного содержания нейтрофилов, моноцитов, эозинофилов, снижение лимфоцитов, а также повышение отношения нейтрофилы/лимфоциты, которое свидетельствуют о развитии системной воспалительной реакции.

3. В образцах костного мозга мышей db/db на I и II стадии сохраняется тенденция к поддержанию исходных значений живых и повреждённых клеток; на III стадии — отмечается снижение живых клеток до 30,6% и повышение повреждённых до 69,39%, преимущественно за счёт клеток в состоянии апонекроза (44,4%) и некроза (17,2%).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Степанова О.И., Клёсов Р.А., Семёнов Х.Х., Помяткин И.А., Онищенко Н.А., Каркищенко В.Н. Способ неинвазивного изучения тканевых нарушений при сахарном диабете 2 типа у мышей db/db с помощью лазерной доплеровской флоуметрии. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2023;67(2):118–129. [Stepanova O.I., Klesov R.A., Semenov Kh.Kh., Pomytkin I.A., Onishchenko N.A., Karkischenko V.N. Spособ neinvazivnogo izucheniya tkanevykh narusheniy pri sakharom diabete 2 tipa u myshey db/db s pomoshch'yu lazernoy dopplerovskoy fluometrii [A method for noninvasive studying tissue disorders in type 2 diabetes mellitus in db/db mice using laser Doppler flowmetry]. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya* [Pathological Physiology and Experimental Therapy]. 2023;67(2):118–129. (In Russian)]. DOI: 10.25557/0031-2991.2023.02.118-129
2. Amend S.R., Valkenburg K.C., Pienta K.J. Murine hind limb long bone dissection and bone marrow isolation. *J. Vis. Exp.* 2016;110:53936. DOI: 10.3791/53936
3. Crowley L.C., Marfell B.J., Scott A.P., Waterhouse N.J. Quantitation of apoptosis and necrosis by annexin V binding, propidium iodide uptake, and flow cytometry. *Cold Spring Harb Protoc.* 2016;2016(11). DOI: 10.1101/pdb.prot087288

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Степанова Ольга Ивановна*, к.б.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: olgsima50@mail.ru

Olga I. Stepanova*, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: olgsima50@mail.ru

Клѣсов Роман Алексеевич, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: klesrom@mail.ru

Roman A. Klesov, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: klesrom@mail.ru

Семѣнов Хызыр Хыйсаевич, к.б.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: info@scbmt.ru

Khyzyr Kh. Semenov, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: info@scbmt.ru

Алчинова Ирина Борисовна, к.б.н., ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»;
e-mail: alchinovairina@yandex.ru

Irina B. Alchinova, Cand. Sci. (Biol.), Research Institute of General Pathology and Pathophysiology;
e-mail: alchinovairina@yandex.ru

Черепов Антон Борисович, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»;
e-mail: antoncherepov2016@gmail.com

Anton B. Cherepov, Research Institute of General Pathology and Pathophysiology;
e-mail: antoncherepov2016@gmail.com

Метѣлкин Аркадий Андреевич, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»;
e-mail: armetelkin@gmail.com

Arkady A. Metelkin, Research Institute of General Pathology and Pathophysiology;
e-mail: armetelkin@gmail.com

Карганов Михаил Юрьевич, д.б.н., проф., ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»;
e-mail: mkarganov@mail.ru

Mikhail Yu. Karganov, Dr. Sci. (Biol.), Prof., Research Institute of General Pathology and Pathophysiology;
e-mail: mkarganov@mail.ru

Никольская Алла Олеговна, к.б.н., ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова» Минздрава России;
e-mail: allanik64@yandex.ru

Alla O. Nikolskaya, Cand. Sci. (Biol.), Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: allanik64@yandex.ru

Онищенко Нина Андреевна, д.м.н., проф., ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова» Минздрава России;
e-mail: allanik64@yandex.ru

Nina A. Onishchenko, Dr. Sci. (Med.), Prof., Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: allanik64@yandex.ru

Басок Юлия Борисовна, д.м.н., ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова» Минздрава России;
e-mail: bjb2005@mail.ru

Yulia B. Basok, Dr. Sci. (Med.), Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: bjb2005@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

<https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-113-116>



ИЗУЧЕНИЕ КРОВОТОКА В ЖЕЛУДКЕ И ТОНКОЙ КИШКЕ МЕТОДОМ УЛЬТРАЗВУКОВОЙ ФЛУОМЕТРИИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Н.С. Тропская^{1,2,*}, Ю.В. Гурман¹, К.В. Заторкина²

¹ ГБУЗ г. Москвы «Научно-исследовательский институт скорой помощи
им. Н.В. Склифосовского ДЗМ»
129090, Российская Федерация, Москва, Б. Сухаревская пл., 3

² ФГБОУ ВО «Московский авиационный институт (национальный исследовательский университет)»
125993, Российская Федерация, Москва, Волоколамское ш., 4

Исследования выполнены на 10 крысах-самцах Wistar. В экспериментах установлены различные адаптационные реакции объёмной скорости кровотока в желудке и тощей кишке голодных и сытых животных на стресс-воздействие — гипотермию. В период максимального охлаждения тела (ниже 32°C) у голодных и сытых животных объёмная скорость кровотока в желудке существенно не изменяется. В тощей кишке объёмная скорость кровотока у голодных животных имеет тенденцию к замедлению, а у сытых — значительно возрастает.

Ключевые слова: объёмная скорость кровотока, желудок, тонкая кишка, гипотермия, крысы

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Тропская Н.С., Гурман Ю.В., Заторкина К.В. Изучение кровотока в желудке и тонкой кишке методом ультразвуковой флуометрии в эксперименте. *Биомедицина*. 2024;20(3E):113–116.
<https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-113-116>

Поступила 15.04.2024

Принята после доработки 03.06.2024

Опубликована 01.11.2024

EXPERIMENTAL STUDY OF BLOOD FLOW IN THE STOMACH AND SMALL INTESTINE USING ULTRASONIC FLOWMETRY

Nataliya S. Tropskaya^{1,2,*}, Yulia V. Gurman¹, Kristina V. Zatorkina²

¹ N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine of the Moscow Health Care Department
129090, Russian Federation, Moscow, Bolshaya Sukharevskaya Sq., 3

² Moscow Aviation Institute (National Research University)
125993, Russian Federation, Moscow, Volokolamskoe Highway, 4

Experiments conducted on 10 male Wistar rats established various adaptive reactions of the rate of blood flow in the stomach and jejunum of hungry and well-fed animals to a stress state modelled by hypothermia. During the period of maximum body cooling (below 32°C), in hungry and well-fed animals, the rate of blood flow in the stomach showed no significant changes. In the jejunum, the rate of blood flow in hungry animals tended to slow down, while it increased significantly in well-fed animals.

Keywords: blood flow rate, stomach, small intestine, hypothermia, rats

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

For citation: Tropskaya N.S., Gurman Yu.V., Zatorkina K.V. Experimental Study of Blood Flow in the Stomach and Small Intestine Using Ultrasonic Flowmetry. *Journal Biomed*. 2024;20(3E):113–116.
<https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-113-116>

Submitted 15.04.2024

Revised 03.06.2024

Published 01.11.2024

Введение

Хорошо известно, что основной функцией системы кровообращения является своевременная доставка тканям крови в объёме, адекватном их метаболическим потребностям. В этом процессе участвуют сердце, выполняющее роль насоса (генератора давления), и огромное количество сосудов, по которым непрерывно циркулирует кровь. Роль крупных сосудов сводится к доставке крови органам и её своевременному оттоку. Внутриорганные сосуды регулируют скорость кровотока в органе и перераспределение крови между участками с различной интенсивностью обменных процессов.

В некоторых органах существует адаптационный механизм к изменениям кровотока, связанный с развитием артериальных коллатералей. Так, абсолютная достаточность коллатералей может достигаться либо с помощью двойного кровоснабжения (печень и лёгкие), либо при параллельно — дуговом типе кровообращения (головной мозг), либо, наконец, при обильных коллатералях (тонкий кишечник) [3].

Гипернатация — искусственно создаваемая и управляемая гипотермия, является способом защиты органов и тканей от стремительно развивающейся гипоксии. Возможность уменьшить потребление кислорода тканями появляется за счёт того, что в организме значительно замедляются метаболические процессы. Общая анестезия традиционно связывается с потерей нормальных терморегуляторных механизмов. Препараты для анестезии влияют на нормальную терморегуляцию путём снижения уровня основного метаболизма и угнетения гипоталамических регулирующих механизмов [1, 2].

При различных исходных функциональных состояниях органов желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) изменение кровотока в желудке и тонкой кишке в ответ на гипотермию может сильно отличаться. Данных литературы по этому вопросу недостаточно.

Цель работы — оценить изменения объёмной скорости кровотока в желудке и тонкой кишке методом ультразвуковой флуометрии у голодных и сытых крыс в условиях искусственной гипотермии.

Материалы и методы

Исследования выполнены на 10 крысах-самцах популяции линий Wistar массой тела 380–450 г в возрасте 12 мес. Протокол исследования был одобрен локальным комитетом по биомедицинской этике НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ.

Все животные содержались в лаборатории в контролируемых условиях окружающей среды при температуре 20–24°C и влажности 45–65%, с режимом освещённости с 8.00 до 20.00 ч — свет, с 20.00 до 8.00 ч — сумеречное освещение. Доступ к корму и воде до начала экспериментов был свободный.

Исследовано две группы животных. В первой группе эксперименты выполняли после 18-часовой депривации, у крыс второй группы (n=5) корм был снят непосредственно перед началом экспериментов.

После введения наркоза крысы помещались на подогреваемый столик. В качестве наркоза использовалась смесь золетила 100 с 2% ксилой в соотношении 1:2, доза смеси составляла 0,6 мл/кг. Выполняли срединную лапаротомию, выделяли и брали на держалки заднюю желудочную артерию и одну из ветвей передней брыжеечной

артерии, питающую начальный участок тощей кишки.

На первом этапе измеряли фоновую температуру тела (ректально).

На втором этапе крыс снимали с подогреваемого столика и помещали на лабораторный стол, создавая таким образом гипотермию. Окончанием второго этапа считалось понижение температуры тела ниже 32°C .

На третьем этапе крысу помещали на подогреваемый столик. Окончанием третьего этапа считалось восстановление температуры тела до фоновых значений.

На всех этапах эксперимента последовательно устанавливали датчики на выделенные артерии, в них измерялся кровоток на протяжении 7–8 мин на каждой артерии. Объёмную скорость кровотока измеряли с помощью ультразвукового флоуметра Transonic T400.

Полученные данные представлялись в виде медианы и перцентилей. Для статистического анализа использовали непараметрические критерии. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

Результаты исследований

У крыс первой группы при осмотре органов ЖКТ в желудке и двенадцатиперстной кишке было небольшое количество жидкого содержимого, петли тощей кишки спавшиеся. Фоновая температура тела составляла $36,6$ ($35,2$; $36,6$) $^{\circ}\text{C}$. Исходные значения кровотока в кишке были выше, чем в желудке и составляли $1,29$ ($1,21$; $1,60$) и $1,03$ ($0,91$; $1,04$) мл/мин соответственно. Через 40–90 мин после индукции гипотермии температура тела становилась $<32^{\circ}\text{C}$. Наблюдалась тенденция к снижению уровня кровотока в эти сроки в брыжеечной артерии до $0,72$ ($0,49$; $0,92$) мл/мин ($p > 0,05$). При этом в желудочной артерии скорость кровотока не изменялась и составляла $1,05$ ($1,01$; $1,06$) мл/мин ($p > 0,05$). После перемещения животного на подогреваемый столик наблюдалось постепенное повышение

температуры тела до исходных значений. Время восстановления температуры тела составило 110–180 мин. Значения скорости кровотока в желудочной и брыжеечной артерии достигали уровня фоновых значений.

У крыс второй группы при осмотре органов ЖКТ в желудке было плотное содержимое, в двенадцатиперстной кишке — жидкий химус в большом количестве. Петли тощей кишки средней наполненности. Фоновая температура тела составляла $36,4$ ($36,2$; $36,9$) $^{\circ}\text{C}$. Исходные значения кровотока в желудке были выше, чем в кишке и составляли $1,25$ ($1,13$; $1,25$) и $1,01$ ($0,97$; $1,06$) мл/мин соответственно. Через 40–90 мин после индукции гипотермии температура тела снижалась до значений $<32^{\circ}\text{C}$. Наблюдалось значительное повышение уровня кровотока в эти сроки в брыжеечной артерии до $2,56$ ($2,48$; $2,62$) мл/мин ($p < 0,05$) по сравнению с исходными значениями. При этом в желудочной артерии кровоток снизился незначительно — $1,09$ ($0,95$; $1,14$) мл/мин ($p > 0,05$). После перемещения животного на подогреваемый столик наблюдалось постепенное повышение температуры тела до исходных значений. Время восстановления температуры тела составило около 140 мин. Значения кровотока в желудочной артерии не отличались от фона, а в брыжеечной артерии значения кровотока были намного выше исходных и составляли $2,17$ ($1,10$; $3,18$) мл/мин ($p < 0,05$). Интересно отметить, что в период восстановления температуры тела наблюдались активные сокращения гладких мышц тощей кишки, которые в свою очередь вызывали активное перемешивание и постепенное перемещение химуса по исследуемой петле тощей кишки, что сопровождалось повышением кровотока в брыжеечной артерии.

Выводы

1. Выявлены различные адаптационные реакции объёмной скорости кровотока в желудке и тощей кишке голодных

и сытых животных на стресс-воздействие — гипотермию.

2. Показатель объёмной скорости кровотока в тощей кишке является очень чувствительным к гипотермии по сравнению с желудком. В период максимального охла-

ждения тела (ниже 32°C) у голодных и сытых животных объёмная скорость кровотока в желудке существенно не изменяется. В тощей кишке скорость кровотока у голодных животных имеет тенденцию к замедлению, а у сытых — значительно возрастает.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Макарук М.А., Мотузко Н.С., Островский А.В., Руденко Л.Л., Кудрявцева Е.Н., Шериков С.Е. *Патология терморегуляции*. Витебск: Изд-во Учреждение образования «Витебская академия "Знак Почета" государственная академия ветеринарной медицины», 2005. [Makaruk M.A., Motuzko N.S., Ostrovskij A.V., Rudenko L.L., Kudryavceva E.N., Sherikov S.E. *Patologiya termoregulyatsii* [Pathology of thermoregulation]. Vitebsk: Izd-vo Uchrezhdenie obrazovaniya "Vitebskaya ordena "Znak Pocheta" gosudarstvennaya akademiya veterinarnoy meditsiny" Publ., 2005. (In Russian)].
2. Сигал З.М., Сурнина О.В., Золотарёв К.Е., Сигал А.М. Изменения интрамуральной гемодинамики и моторики кишки при локальной гипо- и гипертермии. *Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание*. 2019;1:1–5. [Sigal Z.M., Surnina O.V., Zolotaryov K.E., Sigal A.M. Izmeneniya intramural'noy gemodinamiki i motoriki kishki pri lokal'noy gipo- i gipерtermii [Changes in intramural hemodynamics and intestinal motility during local hypo- and hyperthermia]. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy. Elektronnnoe izdanie* [Journal of New Medical Technologies. Electronic edition]. 2019;1:1–5. (In Russian)].
3. Yáñez C., DeMas-Giménez G., Royo S. Overview of biofluids and flow sensing techniques applied in clinical practice. *Sensors (Basel)*. 2022;22(18):6836. DOI: 10.3390/s22186836

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Тропская Наталия Сергеевна*, д.б.н., ГБУЗ г. Москвы «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗМ», ФГБОУ ВО «Московский авиационный институт (национальный исследовательский университет)»;
e-mail: ntropskaya@mail.ru

Nataliya S. Tropskaya*, Dr. Sci. (Biol.), N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine of the Moscow Health Care Department, Moscow Aviation Institute (National Research University);
e-mail: ntropskaya@mail.ru

Гурман Юлия Валерьевна, ГБУЗ г. Москвы «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗМ»;
e-mail: julka_gurman95@mail.ru

Yulia V. Gurman, N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine of the Moscow Health Care Department;
e-mail: julka_gurman95@mail.ru

Заторкина Кристина Владимировна, ФГБОУ ВО «Московский авиационный институт (национальный исследовательский университет)»;
e-mail: kzatorkina@yandex.ru

Kristina V. Zatorkina, Moscow Aviation Institute (National Research University);
e-mail: kzatorkina@yandex.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ВОПРОСЫ ОЦЕНКИ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КАЧЕСТВА ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ В УСЛОВИЯХ ФОРМИРОВАНИЯ РЕГУЛЯТОРНОЙ СИСТЕМЫ ЕАЭС

О.Б. Устинникова*, И.М. Щербаченко, О.Н. Колесникова, Д.Д. Макарищева,
Ю.Е. Исакина, О.Б. Рунова

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России
127051, Российская Федерация, Москва, Петровский б-р, 8/2

Обзор посвящён рассмотрению проблемных вопросов гармонизации фармакопейных подходов к оценке основных физико-химических показателей качества иммунобиологических лекарственных препаратов в условиях формирования регуляторной системы Евро-Азиатского экономического союза и выполнения задач по обеспечению независимости фармацевтического рынка Российской Федерации. В качестве основных физико-химических показателей качества, для оценки которых предусмотрены отечественные и международные фармакопейные методики, были выбраны наиболее значимые показатели: «Белок», «Электрофоретическая однородность», «Молекулярные параметры», характеризующие препараты иммуноглобулинов человека, и показатели «Тиомерсал», «Фенол», «Алюминий», характеризующие качество вакцин и анатоксинов.

Проблемным аспектом гармонизации вышеуказанных методических подходов к оценке того или иного показателя являются исторически сложившиеся различия в требованиях и рекомендациях Государственной фармакопеи Российской Федерации и Европейской фармакопеи, признанной в качестве базовой при разработке гармонизированных требований фармакопеи Евро-Азиатского экономического союза. Данные различия касаются методик, норм по конкретному показателю и подходов к их метрологическому обеспечению (использованию соответствующих контрольных/стандартных образцов). В ходе исследования был проведён сравнительный анализ данных различий; отмечена тенденция перехода большинства производителей на применение методик с использованием высокотехнологичного лабораторного оборудования, ориентированного на методы высокоэффективной жидкостной и/или газовой хроматографии, атомно-абсорбционной спектроскопии; приведена информация о разработке данных методик и наличии соответствующих стандартных образцов. В результате сравнительного анализа сделаны выводы об актуальности разработки и аттестации фармакопейных стандартных образцов для гармонизированных методик определения белка, электрофоретической однородности и молекулярных параметров. Показаны подходы к расширению области применения имеющихся фармакопейных стандартных образцов с учётом использования новых высокотехнологичных методик контроля качества вакцин и анатоксинов по количественному содержанию консервантов и адъювантов. Отмечена ориентированность российской лабораторной фармацевтической практики на специфику иммунобиологических препаратов и использование фармакопейных стандартных образцов, обеспечивающих организацию внутрилабораторного контроля качества испытаний и согласованность результатов разных лабораторий.

Ключевые слова: иммунобиологические лекарственные препараты, стандартные образцы, физико-химические показатели качества

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00026-24-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учёта НИР № 124022200103-5).

Для цитирования: Устинникова О.Б., Щербаченко И.М., Колесникова О.Н., Макарищева Д.Д., Исакина Ю.Е., Рунова О.Б. Перспективные вопросы оценки физико-химических показателей качества иммунобиологических лекарственных препаратов в условиях формирования регуляторной системы ЕАЭС. *Биомедицина*. 2024;20(3Е):117–128. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3Е-117-128>

Поступила 05.08.2024

Принята после доработки 26.08.2024

Опубликована 01.11.2024

ISSUES OF PHYSICOCHEMICAL QUALITY ASSESSMENT OF IMMUNOBIOLOGICAL MEDICINAL PRODUCTS IN THE CONTEXT OF FORMATION OF A REGULATORY SYSTEM IN THE EURASIAN ECONOMIC UNION

**Olga B. Ustinnikova*, Irina M. Shcherbachenko, Oksana N. Kolesnikova,
Daria D. Makarishcheva, Julia E. Isakina, Olga B. Rounova**

*Scientific Centre for Expertise Evaluation of Medicinal Products of the Ministry of Health Care of Russia
127051, Russian Federation, Moscow, Petrovsky Boulevard, 8/2*

In this study, we consider problematic issues associated with harmonization of pharmacopoeial approaches to the assessment of the main physicochemical indicators of immunobiological medicinal products in the context of formation of a regulatory system of the Euro-Asian Economic Union (EAEU) with the purpose of ensuring the independence of the pharmaceutical market of the Russian Federation. Among the selected quality indicators of human immunoglobulin preparations, which are used in national and international pharmacopoeial standards, were selected the following: “Protein”, “Electrophoretic homogeneity”, and “Molecular parameters”. “Thiomersal”, “Phenol”, and “Aluminum” were selected to assess the quality of vaccines and anatoxins.

The harmonization of the above methodological approaches to the assessment of a particular indicator is hampered by the historically evolved differences in the requirements and recommendations of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation and the European Pharmacopoeia, recognized as the basis for the development of harmonized requirements of the EAEU pharmacopoeia. These differences relate to methodologies, standards for a particular indicator, and approaches to their metrological support (use of appropriate reference materials). In the course of the study, a comparative analysis of these differences was carried out. The tendency of most manufacturers to switch to the use of high-tech laboratory equipment based on high-performance liquid and/or gas chromatography and atomic absorption spectrometry is noted. Information on the development of these methods and the availability of appropriate reference materials is provided. The conducted comparative analysis indicates the relevance of the development and certification of pharmacopoeial reference materials for harmonized methods of determination of protein, electrophoretic homogeneity, and molecular parameters. Approaches to extending the application range of available pharmacopoeial reference materials are shown, taking into account the potential of improved methods of quality control of vaccines and anatoxins by quantitative content of preservatives and adjuvants. The Russian laboratory pharmaceutical practice is focused on the specifics of immunobiological preparations and the use of pharmacopoeial reference materials that enable intra- and inter-laboratory quality testing.

Keywords: immunobiological medicinal products, reference materials, physicochemical quality assessment

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

Funding: the study was carried out as part the state assignment of the Scientific Centre for Expertise Evaluation of Medicinal Products of the Ministry of Health Care of Russia No. 056-00026-24-00 for conducting applied scientific research (No. 124022200103-5).

For citation: Ustinnikova O.B., Shcherbachenko I.M., Kolesnikova O.N., Makarishcheva D.D., Isakina Ju.E., Rounova O.B. Issues of Physicochemical Quality Assessment of Immunobiological Medicinal Products in the Context of Formation of a Regulatory System in the Eurasian Economic Union. *Journal Biomed.* 2024;20(3E):117–128. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-117-128>

Submitted 05.08.2024

Revised 26.08.2024

Published 01.11.2024

Введение

Иммунобиологические лекарственные препараты — вакцины, анатоксины, анти-токсические сыворотки, а также препараты иммуноглобулинов, полученные из плазмы крови человека, сегодня востребованы на фармацевтическом рынке, несмотря на развитие современных технологий получения терапевтических белков. На протяжении нескольких десятилетий данные препараты являются незаменимыми для лечения и профилактики тяжёлых патологических состояний, входят в «Перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов для медицинского применения» (распоряжение Правительства РФ № 2406-р от 12.10.2019 г.) и формируют «Национальный календарь профилактических прививок» и «Национальный календарь профилактических прививок по эпидемическим показаниям» (Приказ Минздрава России № 1122н от 06.12.2021 г.).

Ввод в гражданский оборот иммунобиологических лекарственных препаратов (ИЛП) регламентирован постановлением Правительства РФ «О порядке ввода в гражданский оборот лекарственных препаратов для медицинского применения», согласно которому предполагается выдача заключения о соответствии каждой серии или партии ИЛП требованиям, установленным при его государственной регистрации (Постановление № 1510 от 26.11.2019 г.).

Основным источником нормативно-регуляторных требований к качеству ИЛП является Государственная фармакопея РФ (ГФ РФ), в которой изложены фармакопейные статьи, содержащие требования к обяза-

тельной номенклатуре показателей качества препаратов, методам их контроля, нормам и используемым стандартным образцам.

Переход к наднациональной регуляторной системе ЕАЭС в области обращения лекарственных средств во многом обусловлен положениями фармакопеи ЕАЭС, которая в части требований к ИЛП в настоящее время только формируется. В основу формирования фармакопеи ЕАЭС заложен принцип гармонизации требований стран-членов Союза. Согласно решению Коллегии Евразийской экономической комиссии «О концепции гармонизации фармакопей государств — членов Евразийского экономического союза» в качестве базовой признана Европейская фармакопея (EPH) (Решение № 119 от 22.09.2015 г.).

Кроме того, согласно Стратегии «Фарма-2030», положениям постановления Правительства РФ и приказу Минздрава России, курс на обеспечение независимости фармацевтического рынка РФ в условиях санкционной политики диктует необходимость разработки национальных фармакопейных стандартных образцов, являющихся полноценной заменой используемым ранее международным образцам (распоряжение Правительства РФ № 1495-р от 07.06.2023 г.; Постановление № 440 от 23.03.2022 г.; приказ № 202 от 20.03.2020 г.).

Цель исследования — анализ существующей системы оценки физико-химических показателей качества иммунобиологических лекарственных препаратов в условиях формирования гармонизированных требований фармакопеи ЕАЭС и обеспечения независимости фармацевтического рынка РФ.

Система оценки физико-химических показателей качества ИЛП, сформированная одновременно с введением в практику здравоохранения ИЛП, постоянно развивается. Данная система представляет собой комплекс нормативно-регуляторных документов, включая, с одной стороны, фармакопейные требования, и с другой — совокупность методик и соответствующих стандартных образцов.

Номенклатура физико-химических показателей качества индивидуальна для каждого типа препаратов и регламентирована фармакопейными требованиями. При этом для ряда основных показателей, играющих ключевую роль в обеспечении безопасности и эффективности ИЛП, регламентированы фармакопейные методики, изложенные в ГФ РФ в форме общих фармакопейных статей и/или в Европейской фармакопее в форме монографий.

К числу основных физико-химических показателей качества, для оценки которых предусмотрены фармакопейные методики, относятся: «Белок», «Электрофоретическая однородность», «Молекулярные параметры», «Тиомерсал», «Фенол», «Алюминий».

Проблемным аспектом гармонизации методических подходов к оценке того или иного показателя являются различия в методиках, изложенных в ГФ РФ и ЕРh, и в подходах к их метрологическому обеспечению (использование соответствующих контрольных/стандартных образцов).

Препараты иммуноглобулинов человека

Препараты иммуноглобулинов человека (ИГЧ), полученные из плазмы крови человека, незаменимы в терапии первичных и вторичных иммунодефицитных состояний, аутоиммунных заболеваний, а также широко используются для профилактики и лечения целого ряда вирусных и бактериальных инфекций [6, 11, 14, 16–19, 21].

Согласно международным и отечественным фармакопейным требованиям, одним из обязательных физико-химических

показателей качества, обеспечивающих безопасность и эффективность препаратов ИГЧ, являются «Электрофоретическая однородность», «Молекулярные параметры» и «Белок». Данные показатели нормируют общее содержание целевого белка и его состав: допустимое суммарное содержание нецелевых белков сыворотки крови человека — альбумина, α -, β -глобулинов и молекулярно-массовое распределение белков и пептидов, составляющих γ -глобулиновую целевую фракцию (ГФ РФ XIV ОФС.1.8.1.0003.15, ФС.3.3.2.0007.15, ФС.3.3.2.0008.15; ЕРh 11.6. Monographs 04/2024:0918, 04/2024:0338, 04/2024:2788).

Нормы содержания белка в препаратах ИГЧ, установленные ГФ РФ, могут быть различны в зависимости от типа иммуноглобулина и в целом охватывают диапазон от 4,5 до 16%. Требования ЕРh также нормируют содержание белка в зависимости от типа препарата и охватывают диапазон от 3 до 22%.

В соответствии с требованиями ГФ РФ определение показателя качества «Белок» в препаратах ИГЧ проводят колориметрическим методом с биуретовым реактивом в соответствии с ОФС.1.8.2.0010.18 «Количественное определение белка колориметрическим методом с биуретовым реактивом в препаратах крови человека и животных». Методика предполагает наличие стандартного образца (СО), аттестованная характеристика которого представлена в виде номинальной величины, позволяющей проводить расчёт количественного содержания белка в испытуемом образце относительно стандартного. В качестве СО большинство отечественных производителей используют фармакопейный стандартный образец (ФСО) содержания белка в иммуноглобулине (ФСО.3.1.00340) [6].

Согласно требованиям ЕРh, определение белка в препаратах ИГЧ рекомендуется проводить с помощью минерализации серной кислотой с последующим расчётом ко-

личественного содержания белка по содержанию азота (EPH 11.6, monograph 2.5.9). Большинство зарубежных производителей препаратов ИГЧ, зарегистрированных в РФ, используют метод Кьельдаля с применением автоматических анализаторов азота. Стандартный образец для расчёта количественного содержания белка в данных методиках не требуется, поскольку расчёт ведётся по раствору сульфата (хлорида) аммония, приготовленного по точной навеске или количеству титранта.

При формировании требований фармакопии ЕАЭС к определению белка в препаратах ИГЧ предполагается использование метода Кьельдаля. При использовании данного метода необходимо учитывать требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий в части оценки неопределённости измерений (ГОСТ ISO/IEC 17025-2019), а также обеспечения внутрилабораторного контроля качества (РМГ 76-2014). Кроме того, для данного показателя необходимо обеспечить согласованность результатов, полученных в контрольно-аналитических лабораториях производителей и сторонних лабораториях, проводящих экспертную оценку или оценку соответствия качества. В качестве метрологического инструмента, обеспечивающего ВКК и согласованность результатов, целесообразно разработать и аттестовать ФСО, с присвоением аттестованной характеристики в виде установленного диапазона величин (ФСО правильности).

В соответствии с ГФ РФ определение показателя «Электрофоретическая однородность» проводят по методике, указанной в ОФС.1.8.2.0009.15 «Определение однородности лекарственных препаратов из сыворотки крови человека и животных методом электрофореза на плёнках их ацетата целлюлозы». Согласно данной ОФС (общей фармакопейной статье), для препаратов иммуноглобулинов для внутримышечного и внутривенного введения требование к со-

держанию целевого белка составляет не менее 95% от общего белка. Учёт результатов электрофоретического разделения предусматривает, что «...идентификацию белковых фракций проводят путём сравнения электрофореграммы испытуемых образцов с электрофореграммой контрольной сыворотки для контроля качества электрофоретического разделения белковых фракций». В качестве контрольной сыворотки ранее в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России был аттестован ФСО.3.1.00443, предназначенный для оценки пригодности системы при определении электрофоретической однородности/подлинности препаратов из сыворотки крови человека методом электрофореза на мембранах из ацетата целлюлозы с дальнейшим денситометрическим определением белковых фракций. В качестве исходного материала для аттестации использовали нормальную сыворотку крови человека для диагностических целей, полученную из плазмы человека путём центрифугирования с 1% р-ром кальция хлорида. Аттестованная характеристика составляла: альбумины — 46,58–59,18%; α 1-глобулин — 3,06–6,08%; α 2-глобулин — 6,44–9,64%; β -глобулин — 10,40–13,84%; γ -глобулин — 18,39–26,35%. Аналогичный международный (европейский) стандартный образец отсутствует.

На сегодняшний день большинство отечественных производителей препаратов иммуноглобулинов используют оборудование УЭФ-01-«Астра» и набор реагентов «КлиниТест-ЭФ», в состав которого входит контрольная сыворотка. Учёт результатов при использовании данной контрольной сыворотки аналогичен результату, получаемому при использовании ФСО.3.1.00443: возможность идентификации каждого из 5 компонентов сыворотки (альбумина, α 1-глобулина, α 2-глобулина, β -глобулина, γ -глобулина) в нормируемом диапазоне согласно сертификату на конкретную серию контрольной сыворотки. В связи с этим

ФСО.3.1.00443 в настоящее время не проходит переаттестацию и/или аттестацию новой серии.

Согласно требованиям EPh, показатель, характеризующий чистоту γ -глобулиновой фракции от посторонних сывороточных белков, носит название «Protein composition» и определяется методом зонального электрофореза, где в качестве носителя могут быть использованы агарозный гель или ацетатцеллюлозные пластины. Требования к содержанию примесных белков следующие: «На электрофореграмме испытуемого раствора не более 10% белков должны иметь подвижность, отличную от подвижности основной полосы» (для иммуноглобулинов для внутримышечного введения) и «На электрофореграмме испытуемого раствора не более 5% белков должны иметь подвижность, отличную от подвижности основной полосы» (для иммуноглобулинов для внутривенного введения).

В качестве контрольного р-ра в монографии EPh, так же как и в ГФ РФ, предполагается использование сыворотки крови человека. При этом требование к контрольной сыворотке иное и состоит в идентификации полосы альбумина на расстоянии не менее 30 мм от линии старта. Кроме того, в качестве р-ра сравнения предполагается использование стандартного образца иммуноглобулина человека для электрофореза BRP (Human immunoglobulin for electrophoresis, biological reference preparation (BRP), H1000000, EDQM) [7]. Выполнение требования к стандартному р-ру гарантирует пригодность системы: на электрофореграмме, полученной с использованием стандартного р-ра, содержание белка в основной полосе должно находиться в пределах, указанных в инструкции, прилагаемой к стандартному образцу. Аналогичный отечественный (фармакопейный) стандартный образец отсутствует, а вышеуказанный стандартный образец BRP не имеет практики применения в Российской Федерации.

Методики и нормы, изложенные в ГФ РФ и EPh, имеют некоторые процедурные отличия: в качестве носителя могут быть использованы плёнки из ацетата целлюлозы (ГФ РФ и EPh) или агарозный гель (EPh); в качестве красителя — Амидо-чёрный 10Б (ГФ РФ и EPh) или Пунцовый С (ГФ РФ); Барбиталовый буферный р-р pH=8,4–8,6 (ГФ РФ и EPh) или Трис-гидрохлоридный буферный р-р pH=8,8 (EPh).

Детальные расхождения в процедуре методики могут быть связаны с конкретной моделью используемого оборудования (объём наносимой пробы, расстояние от линии старта, условия разделения — сила тока, напряжение и т. д.). При этом подход к учёту достоверности результатов анализа (условия применения контрольных и стандартных образцов), как было сказано выше, имеет существенные отличия.

Учитывая вышеизложенное, при формировании общих требований целесообразно излагать основные условия методики, избегая излишней детализации. Что касается оценки результатов электрофоретического разделения с применением контрольных/стандартных образцов, гармонизированный подход может быть реализован путём возобновления практики использования в качестве контрольной сыворотки новой серии ФСО.3.1.00443, а также разработки и аттестации ФСО, являющегося полноценной заменой образца BRP H1000000 (EDQM) для электрофореза. Наличие действующей серии ФСО.3.1.00443 позволит стандартизировать условия воспроизведения анализа, отвечающие концепции фармакопеи ЕАЭС, исключить ориентированность на использование конкретного оборудования и набора реагентов, а наличие ФСО, аналогичного образцу BRP, позволит гармонизировать условия учёта приемлемости результатов испытания с требованиями EPh.

Характеристика препаратов ИГЧ по показателю «Молекулярные параметры» необходима для оценки молекулярно-массо-

вого распределения белков, составляющих γ -глобулиновую фракцию. При этом целевыми компонентами, обеспечивающими эффективность препаратов ИГЧ, являются мономер IgG и его димерная форма. Кроме мономера и димера, в составе препарата могут присутствовать низкомолекулярные компоненты, являющиеся продуктом деструкции молекулы IgG, — фрагменты, а также высокомолекулярные компоненты — полимеры и агрегаты. Потенциально опасными примесями, наличие которых может приводить к нежелательным явлениям, являются высокомолекулярные соединения [9].

Нормы по содержанию «мономеров и димеров» и «полимеров и агрегатов» в ГФ РФ и EPh согласованы и составляют для иммуноглобулинов для внутримышечного введения «не менее 85% и не более 10%», а для иммуноглобулинов для внутривенного введения — «не менее 90% и не более 3%» соответственно.

Молекулярные параметры препаратов ИГЧ начали определять в 1970-х гг. [15]. Для оценки данного показателя использовали метод гель-фильтрации низкого давления, основанный на разделении ИГЧ на фракции в зависимости от размера и молекулярной массы белковых компонентов, входящих в его состав. Оценку пригодности хроматографической системы, а также идентификацию хроматографических пиков, полученных для мономеров, димеров, полимеров, агрегатов и фрагментов испытуемого образца, проводили с использованием белков-маркеров молекулярных масс, а также отраслевого стандартного образца (ОСО) иммуноглобулина для калибровки хроматографической колонки (42-28-301-98).

В настоящее время все отечественные и зарубежные производители препаратов ИГЧ для оценки молекулярных параметров используют метод эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [10]. Испытания проводят согласно ГФ РФ ОФС.1.8.2.0006.15 «Определение

молекулярных параметров иммуноглобулинов методом ВЭЖХ». Данная ОФС содержит общие рекомендации к воспроизведению методики эксклюзионной ВЭЖХ, которые предусматривают описание хроматографических условий, приготовление подвижной фазы, пробоподготовку испытуемого образца, а также содержат указание на необходимость использования маркеров молекулярных масс в диапазоне от 10 до 600 кДа для калибровки хроматографической колонки и стандартного образца для подтверждения пригодности хроматографической системы.

В EPh отсутствует отдельная монография, посвящённая методике определения молекулярных параметров препаратов ИГЧ, однако в монографиях EPh 04/2024:0918; 04/2024:0338; 04/2024:2788 приведены условия хроматографического разделения (характеристика сорбента и размеры колонки; состав и скорость потока подвижной фазы; длина волны УФ-детектора), диапазон концентраций испытуемого и стандартного образцов, способ учёта и интерпретации полученных результатов, а также требования нормы по количественной оценке молекулярных параметров.

Несмотря на достаточно подробные рекомендации по определению молекулярных параметров ИГЧ, приведённые в EPh, нормативная документация производителей зачастую предусматривает различные варианты методики, отличающиеся выбором типа хроматографических колонок, состава и скорости подвижной фазы; способа расчёта результата испытаний.

На сегодняшний день стандартный образец BRP (Human immunoglobulin (molecular size) BRP, кат. № Y0000488), включённый практически во все зарубежные и отечественные нормативные документы, является единственным СО для определения молекулярных параметров иммуноглобулинов [8, 20]. С целью обеспечения независимости национального фармацевтического рынка

препаратов ИГЧ очевидна необходимость разработки и аттестации фармакопейного стандартного образца, являющегося полноценной заменой BRP Y0000488 (EDQM).

Вакцины, анатоксины, антитоксические сыворотки

Основными физико-химическими показателями качества вакцин, анатоксинов и антитоксических сывороток, потенциально влияющими на безопасность и эффективность данных групп препаратов, является количественное определение консервантов (тиомерсал, фенол, 2-феноксизтанол) и адъювантов (гель гидроксида алюминия, фосфата алюминия). Содержание данных веществ в составе ИЛП нормируется в зависимости от типа препарата. Их определение регламентировано фармакопейными методиками, включёнными в ГФ РФ и EPh. Следует отметить, что в последние годы существенно возросла востребованность в высокотехнологичном оборудовании при контроле качества ИЛП, что привело к отказу ряда производителей от фармакопейных методик, основанных на традиционном количественном спектрофотометрическом, колориметрическом и титриметрическом химическом анализе в пользу более современных методов ВЭЖХ, газовой хроматографии и атомно-абсорбционной спектроскопии.

Тиомерсал входит в состав ряда вакцин (АКДС, АДС, АС, АД, АКДС-геп В-вакцины, против гриппа) и анатоксинов. Содержание тиомерсала ограничено общим диапазоном от 30 до 120 мкг/мл, при этом конкретные нормы индивидуальны для каждого типа препарата [12, 13]. Количественное определение тиомерсала обязательно для каждой серии готового препарата и обеспечено фармакопейной методикой, изложенной в ГФ РФ ОФС.1.7.2.0025.18 «Количественное определение тиомерсала в биологических лекарственных препаратах». До недавнего времени в данной ОФС были изложены

два метода: колориметрический, основанный на выделении ионов ртути и образования окрашенного комплекса с дитизионом, и полярографический метод. Фактически использовался только колориметрический метод, обеспеченный стандартными образцами для подтверждения правильности определения: ФСО 3.1.00427, предназначенный для препаратов с высоким содержанием тиомерсала от 80 до 120 мкг/мл, и ФСО 3.1.00471, предназначенный для препаратов с низким содержанием тиомерсала от 30 до 80 мкг/мл [5].

В 2018 г. в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России была завершена разработка и валидация методики определения тиомерсала в сорбированных и несорбированных ИЛП на основе метода атомно-абсорбционной спектроскопии холодного пара (ААС-ХП) [2]. Данная методика была включена в ГФ РФ ОФС.1.7.2.0025.18. При этом задача метрологического обеспечения данной методики стандартным образцом правильности была решена путём сопоставления результатов определения ионов ртути, полученных колориметрической методикой и методикой ААС-ХП. Сопоставление осуществляли с использованием однофакторного дисперсионного анализа с вычислением критерия Фишера. Данный подход позволил сделать вывод об отсутствии статистически значимых различий между выборками и возможности рассмотрения значений, полученных колориметрической методикой и методикой ААС-ХП, как одной совокупности результатов (подтверждение нулевой гипотезы). Это позволило расширить область применения указанных выше ФСО, аттестованных колориметрической методикой, на методику ААС-ХП без изменения аттестованной характеристики [3].

В EPh отдельная монография для количественной оценки тиомерсала в ИЛП отсутствует и стандартные образцы не предусмотрены, а метод ААС-ХП рекомендован для препаратов растительного происхож-

дения (остаточные количества, следы), без описания конкретной методики (EPH 11.6, monograph 07/2014:20427).

Постепенный отказ от использования в качестве консервантов ртутьсодержащих соединений привёл к появлению группы препаратов, имеющих фенол (или производные фенола — 2-феноксизтанол) в качестве консерванта: аллергены, полисахаридные вакцины. Содержание фенола ограничено общим диапазоном от 1,5 до 4,0 мг/мл, при этом конкретные нормы, так же, как и для тиомерсала, индивидуальны для каждого типа препарата.

В соответствии с ГФ РФ определение показателя «Фенол» проводят согласно «ОФС.1.7.2.0028.18 «Количественное определение фенола в биологических лекарственных препаратах». До недавнего времени в данной ОФС была изложена спектрофотометрическая методика определения, основанная на прямом измерении разницы поглощения фенола и окрашенных примесей. Исходно методика была ориентирована на препараты аллергенов и позднее верифицирована для ряда отечественных полисахаридных вакцин (SU, патент 989410, 1983).

В 2018 г. в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России была завершена разработка и валидация методики количественного определения фенола в ИЛП на основе метода газовой хроматографии (Патент № 2693518 от 03.07.2019 г.).

В EPh описана колориметрическая методика определения фенола в ИЛП, в основе которой лежит цветная реакция фенола с аминопиразолом (4-аминоантипирин) в присутствии ферроцианида калия (EPH 11.6, monograph 01/2008:20515). Данную методику или её модификацию используют некоторые зарубежные производители. Стандартные образцы не предусмотрены.

В 2021 г. в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России были аттестованы ФСО для подтверждения правильности определения фе-

нола — ФСО 3.1.00449 содержания фенола (спектрофотометрический метод) и ФСО 3.1.00451 содержания фенола (метод газожидкостной хроматографии), — имеющие различный аттестованный диапазон, поскольку однофакторный дисперсионный анализ по критерию Фишера позволил выявить статистически значимые различия прецизионности (воспроизводимости) этих двух методических подходов при сохранении правильности определения [4, 5].

Соединения на основе алюминия (гель гидроксида алюминия, фосфат алюминия) входят в состав многих ИЛП, включая вакцины календаря прививок, ветеринарные вакцины и анатоксины. Эти соединения остаются наиболее популярными адъювантами, несмотря на разработку новых веществ [1]. Содержание адъюванта индивидуально для каждого типа препарата и ограничено общим диапазоном от 0,2 до 1,8 мг/мл. Количественный анализ предполагает определение ионов алюминия в каждой серии готового препарата с последующим пересчётом на конечное соединение.

В ГФ РФ для ИЛП предусмотрена фармакопейная методика комплексонометрического титрования, изложенная в виде ОФС.1.7.2.0016.15 «Определение ионов алюминия в сорбированных биологических лекарственных препаратах», обеспеченная стандартными образцами для подтверждения правильности определения: ФСО 3.1.00470, предназначенный для препаратов с содержанием алюминия от 0,2 до 0,7 мг/мл; ФСО 3.1.00333, предназначенный для препаратов с содержанием алюминия от 0,8 до 1,3 мг/мл; и ФСО 3.1.00423, предназначенный для препаратов с содержанием алюминия от 1,4 до 1,8 мг/мл [9].

Согласно EPh для количественной оценки алюминия в ИЛП также используется методика комплексонометрического титрования, изложенная в виде монографии «Aluminium in absorbed vaccines» (EPH 11.6, monograph 01/2008:20513). Данная мето-

дика содержит несущественные отличия от методики ГФ РФ в части концентраций реагентов и их соотношения в реакционной смеси, стандартные образцы не предусмотрены.

В 2022 г. в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России была разработана и валидирована методика количественного определения ионов алюминия в сорбированных препаратах методом атомно-абсорбционной спектроскопии с электротермической атомизацией (ААС-ЭТ) (патент № 2799235 от 04.07.2023 г.). Так же, как и для тиомерсала, оценка сопоставимости результатов, полученных фармакопейной методикой комплексометрического титрования и методикой ААС-ЭТ, на основании данных однофакторного дисперсионного анализа, показала отсутствие статистически значимых различий и подтвердила возможность расширения области применения имеющихся ФСО.

Заключение

Анализ отечественной и международной практики лабораторной фармацевтиче-

ской экспертизы ИЛП по физико-химическим показателям позволяет утверждать, что практика, сложившаяся в Российской Федерации, ориентирована на специфику иммунобиологических препаратов и основана на использовании фармакопейных стандартных образцов, обеспечивающих организацию внутрилабораторного контроля качества испытаний и согласованность результатов разных лабораторий.

С целью гармонизации методических подходов оценки основных физико-химических показателей качества, а также обеспечения независимости отечественной фармацевтической лабораторной экспертизы препаратов ИГЧ целесообразно разработать и аттестовать фармакопейные стандартные образцы для методик определения белка, электрофоретической однородности и молекулярных параметров. При формировании фармакопейных гармонизированных требований ЕАЭС по оценке консервантов (тиомерсал, фенол) и адьювантов на основе алюминия в ИЛП целесообразно учитывать опыт Российской Федерации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

- Исаенко Е.Ю., Бабич Е.М., Елисеєва И.В., Ждамарова Л.А., Белозерский В.И., Колпак С.А. Адьюванты в современной вакцинологии. *Annals of Mechnikov Institute*. 2013;4:4–21. [Isayenko Y.Y., Babych Y.M., Yelyseyeva I.V., Zhdamarova L.A., Belozersky V.I., Kolpak S.A. Ad'yuvanty v sovremennoy vaksinologii [Adjuvants in modern vaccinology]. *Annals of Mechnikov Institute*. 2013;4:4–21. (In Russian)].
- Колесникова О.Н., Устинникова О.Б., Рунова О.Б., Бондарев В.П. Определение мертиолята в несорбированных ИЛП методом атомно-абсорбционной спектроскопии холодного пара (ААС-ХП) по ионам ртути. Ч. 1: отработка методики и оценка результатов определения ионов ртути колориметрическим методом и методом ААС-ХП. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2015;54(2):59–63. [Kolesnikova O.N., Ustinnikova O.B., Runova O.B., Bondarev V.P. Opredelenie mertiol'yata v nesorbirovannykh ILP metodom atomno-absorbtsionnoy spektroskopii kholodnogo para (AAS-KhP) po ionam rtuti. Ch. 1: otrabotka metodiki i otsenka rezul'tatov opredeleniya ionov rtuti kolorimetricheskim metodom i metodom AAS-KhP [Determination of thimerosal in non-adsorbed immunobiological preparations by cold vapor atomic absorption spectroscopy (CV AAS) for the ions of mercury. Part 1: method development and evaluation of statistical significance of differences in the results of mercury ions determination by colorimetric method and cold vapor atomic absorption spectroscopy method]. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie* [BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment]. 2015;54(2):59–63. (In Russian)].
- Колесникова О.Н., Трегубова В.Е., Устинникова О.Б., Мовсесянц А.А. Оценка сопоставимости результатов определения тиомерсала колориметрическим методом и методом атомно-абсорбционной спектроскопии холодного пара в иммунобиологических лекарственных препаратах. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2022;22(3):318–330. [Kolesnikova O.N., Tregubova V.E., Ustinnikova O.B., Movsesyants A.A. Otsenka sopostavimosti rezul'tatov opredeleniya tio-

- mersala kolorimetricheskim metodom i metodom atomno-absorbtsionnoy spektrometrii kholodnogo para v immunobiologicheskikh lekarstvennykh preparatakh [Comparability assessment of the results of thiomersal quantification in adsorbed immunobiological medicinal products by colourimetry and by cold vapor atomic absorption spectrometry]. *BIOpriparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie* [BIOpriparations. Prevention, Diagnosis, Treatment]. 2022;22(3):318–330. (In Russian)]. DOI: 10.30895/2221-996X-2022-22-3-318-330
4. Колесникова О.Н., Фадейкина О.В., Устинникова О.Б., Волкова Р.А., Мовсесянц А.А. Разработка и аттестация стандартных образцов содержания фенола в биологических лекарственных препаратах с учётом сопоставимости результатов, полученных методами ГЖХ, ВЭЖХ, спектрофотометрии и колориметрии. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2021;21(3):193–199. [Kolesnikova O.N., Fadeikina O.V., Ustinnikova O.B., Volkova R.A., Movsesyants A.A. Razrabotka i attestatsiya standartnykh obraztsov soderzhaniya fenola v biologicheskikh lekarstvennykh preparatakh s uchetom sopostavimosti rezul'tatov, poluchennykh metodami GZhKh, VEZhKh, spektrofotometrii i kolorimetrii [Development and certification of reference standards for phenolic content in biologicals, based on comparison of results obtained by GLC, HPLC, spectrophotometric, and colorimetric methods]. *BIOpriparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie* [BIOpriparations. Prevention, Diagnosis, Treatment]. 2021;21(3):193–199. (In Russian)]. DOI: 10.30895/2221-996X-2021-21-3-193-199
 5. Реестр фармакопейных стандартных образцов Государственной Фармакопеи Российской Федерации [Reestr farmakopeynykh standartnykh obraztsov Gosudarstvennoy Farmakopei Rossiyskoy Federatsii [Register of Pharmacopoeial Standard Samples of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation]]. (In Russian)].
 6. Солдатов А.А., Авдеева Ж.И., Горенков Д.В., Хантимирова Л.М., Парамонова Ю.С., Смолина Е.М., Бондарев В.П., Меркулов В.А. Эффективность применения препаратов на основе иммуноглобулинов плазмы и моноклональных антител для лечения и профилактики COVID-19. *Иммунология*. 2022;43(5):485–503. [Soldatov A.A., Avdeeva Zh.I., Gorenkov D.V., Khantimirova L.M., Paramonova Yu.S., Smolina E.M., Bondarev V.P., Merkulov V.A. Effektivnost' primeneniya preparatov na osnove immunoglobulinov plazmy i monoklona'nykh antitel dlya lecheniya i profilaktiki COVID-19 [The efficacy of medicinal products based on plasma immunoglobulins and monoclonal antibodies for the treatment and prevention of COVID-19]. *Immunology*. 2022;43(5):485–503. (In Russian)]. DOI: 10.33029/0206-4952-2022-43-5-485-503
 7. Behr-Gross M.E., Daas A., Christians S. Collaborative study for the establishment of the human immunoglobulin for electrophoresis Ph. Eur. BRP batch 3. *Pharmeur. Bio. Sci. Notes*. 2014;2014:71–80.
 8. Karra D., Regourd E., Costanzo A. Collaborative study for the establishment of human immunoglobulin BRP replacement batches. *Pharmeur. Bio. Sci. Notes*. 2018;2018:37–61.
 9. Chirmule N., Jawa V., Meibohm B. Immunogenicity to therapeutic proteins: Impact on PK/PD and efficacy. *AAPS J.* 2012;14(2):296–302. DOI: 10.1208/s12248-012-9340-y
 10. Christians S., Schluender S., van Treel N.D., Behr-Cross M.E. Interpretation of size-exclusion chromatography for the determination of molecular-size distribution of human immunoglobulins. *Pharmeur. Bio. Sci. Notes*. 2016;2016:115–128.
 11. Danieli M.G., Gelardi C., Pedini V., Moretti R., Gabrielli A., Logullo F. Subcutaneous IgG in immune-mediated diseases: Proposed mechanisms of action and literature review. *Autoimmun Rev.* 2014;13(12):1182–1188. DOI: 10.1016/j.autrev.2014.08.018
 12. EMA Points to Consider on the Reduction, Elimination or Substitution of Thiomersal in Vaccines. 2001.
 13. FDA Thimerosal and Vaccines.
 14. Gröning R., Walde J., Ahlm C., Forsell M., Normark J., Rasmuson J. Intravenous immunoglobulin therapy for COVID-19 in immunocompromised patients: A retrospective cohort study. *Int. J. Infect. Dis.* 2024;144:107046. DOI: 10.1016/j.ijid.2024.107046
 15. *Immunoglobulinum Normale Humanum, European Pharmacopoeia*. France. 1971;2:247–251.
 16. Lasek-Bal A., Wagner-Kusz A., Rogoż B., Cisowska-Babraj M., Gajewska G. Efficacy and safety of intravenous immunoglobulin treatment in selected neurological diseases — One centre's experience based on the therapy of 141 patients. *J. Clin. Med.* 2023;12(18):5983. DOI: 10.3390/jcm12185983
 17. Misbah S., Sturzenegger M.H., Borte M., Shapiro R.S., Wasserman R.L., Berger M., Ochs H.D. Subcutaneous immunoglobulin: Opportunities and outlook. *Clin. Exp. Immunol.* 2009;158:51–59. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2009.04027.x
 18. Orange J.S., Hossny E.M., Weiler C.R., Ballow M., Berger M., Bonilla F.A., Buckley R., Chinen J., El-Gamal Y., Mazer B.D., Nelson R.P. Jr., Patel D.D., Secord E., Sorensen R.U., Wasserman R.L., Cunningham-Rundles C.; Primary Immunodeficiency Committee of the American Academy of Allergy, Asthma and Immunology. Use of intravenous immunoglobulin in human disease: A review of evidence by members of the Primary Immunodeficiency Committee of the American Academy of Allergy, Asthma and Immunology. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2006;117(4 Suppl):S525–S553. DOI: 10.1016/j.jaci.2006.01.015
 19. Radosevich M., Burnouf T. Intravenous immunoglobulin G: Trends in production methods, quality control and quality assurance. *Vox Sang.* 2010;98(1):12–28. DOI: 10.1111/j.1423-0410.2009.01226.x

20. Sandberg E. Collaborative study for establishment of human immunoglobulin Biological Reference Preparation (BRP). *Pharmeuropa Special Issue Bio.* 1996;1:49–69.
21. Yi J., Dalakas M.C. Long-term effectiveness of IVIg maintenance therapy in 36 patients with GAD antibody-positive stiff-person syndrome. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflamm.* 2022;9(5):e200011. DOI: 10.1212/NXI.0000000000200011

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Ольга Борисовна Устинникова*, к.б.н., ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России;
e-mail: ustinnikova@expmed.ru

Olga B. Ustinnikova*, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Centre for Expertise Evaluation of Medicinal Products of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: ustinnikova@expmed.ru

Ирина Михайловна Щербаченко, к.б.н., ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России;
e-mail: sherbachenko@expmed.ru

Irina M. Shcherbachenko, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Centre for Expertise Evaluation of Medicinal Products of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: sherbachenko@expmed.ru

Оксана Николаевна Колесникова, ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России;
e-mail: kolesnikovao@expmed.ru

Oksana N. Kolesnikova, Scientific Centre for Expertise Evaluation of Medicinal Products of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: kolesnikovao@expmed.ru

Дарья Дмитриевна Макарищева, ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России;
e-mail: makarishchevadd@expmed.ru

Daria D. Makarishcheva, Scientific Centre for Expertise Evaluation of Medicinal Products of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: makarishchevadd@expmed.ru

Юлия Евгеньевна Исакина, ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России;
e-mail: isakina@expmed.ru

Julia E. Isakina, Scientific Centre for Expertise Evaluation of Medicinal Products of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: isakina@expmed.ru

Ольга Борисовна Рунова, к.х.н., ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России;
e-mail: runova@expmed.ru

Olga B. Rounova, Cand. Sci. (Chem.), Scientific Centre for Expertise Evaluation of Medicinal Products of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: runova@expmed.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ КОРРЕКЦИЯ ПЕПТИДНЫМИ ПРЕПАРАТАМИ ФИЗИЧЕСКОЙ РАБОТОСПОСОБНОСТИ САМЦОВ КРЫС ПРИ ИЗМЕНЕНИИ СВЕТОВОГО РЕЖИМА

А.В. Шарабанов^{1,*}, Е.Г. Батоцыренова^{2,3}, В.А. Кашуро^{3,4,5}, М.Т. Гасанов¹

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

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

³ ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский
университет» Минздрава России
194100, Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул. Литовская, 2

⁴ ФГБОУ ВО «Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена»
191186, Российская Федерация, Санкт-Петербург, наб. реки Мойки, 48

⁵ ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»
199034, Российская Федерация, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9

В данном исследовании изучалось влияние экстрактов пептидной природы из эпифиза-гипофиза северного оленя (*Rangifer tarandus*) и дельта-сон индуцирующего пептида, имитируя модифицированное высвобождение, на физическую работоспособность самцов крыс в условиях светового десинхроноза. Все тестируемые средства позитивно влияли на физическую работоспособность самцов крыс, увеличивая длительность первого и второго плавания в зависимости от режима освещения и степени десинхронизации, при этом эффективность также показана после окончания курсового интраназального введения (сформированный световой десинхроноз), что свидетельствует об их пролонгированном действии. Такой способ фармакологической настройки циркадианных осцилляторов организма средствами пептидной природы с модифицированным высвобождением может быть использован для разработки схемы коррекции светового десинхроноза.

Ключевые слова: экстракты пептидной природы, модифицированное действие, световой десинхроноз, биоактивные пептиды эпифиза и гипофиза, фармакологическая коррекция

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Шарабанов А.В., Батоцыренова Е.Г., Кашуро В.А., Гасанов М.Т. Фармакологическая коррекция пептидными препаратами физической работоспособности самцов крыс при изменении светового режима. *Биомедицина*. 2024;20(3E):129–134. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-129-134>

Поступила 13.04.2024

Принята после доработки 20.05.2024

Опубликована 01.11.2024

PHARMACOLOGICAL CORRECTION OF PHYSICAL PERFORMANCE IN MALE RATS WITH PEPTIDE PREPARATIONS WHEN CHANGING THE LIGHTING REGIME

Andrey V. Sharabanov^{1,*}, Ekaterina G. Batotsyrenova^{2,3},
Vadim A. Kashuro^{3,4,5}, Melik T. Gasanov¹

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 Golikov Research Center of Toxicology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia
192019, Russian Federation, Saint Petersburg, Bekhtereva Str., 1

³ Saint Petersburg State Pediatric Medical University of the Ministry of Health Care of Russia
194100, Russian Federation, Saint Petersburg, Litovskaya Str., 2

⁴ Herzen Russian State Pedagogical University
191186, Russian Federation, Saint Petersburg, Moika River Emb., 48

⁵ Saint Petersburg State University
199034, Russian Federation, Saint Petersburg, Universitetskaya Emb., 7/9

This study examined the effect of peptide extracts from the epiphysis-pituitary gland of reindeer (*Rangifer tarandus*) and delta-sleep-inducing peptide, simulating modified release, on the physical performance of male rats under conditions of light desynchronization. All tested agents had a positive effect on the physical performance of male rats, increasing the duration of the first and second swim, depending on the lighting regime and the degree of desynchronization. In addition, the effectiveness of the tested agents was also noted after a course of intranasal administration (formed light desynchronization), which indicates their prolonged action. This method of pharmacological tuning of the body's circadian oscillators by agents of a peptide nature with a modified release can be used to develop a scheme for correcting light desynchronization.

Keywords: peptide extracts, modified action, light desynchronization, bioactive peptides of the pineal gland and pituitary gland, pharmacological correction

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

For citation: Sharabanov A.V., Batotsyrenova E.G., Kashuro V.A., Gasanov M.T. Pharmacological Correction of Physical Performance in Male Rats with Peptide Preparations when Changing the Lighting Regime. *Journal Biomed.* 2024;20(3E):129–134. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-129-134>

Submitted 13.04.2024

Revised 20.05.2024

Published 01.11.2024

Введение

Различные организмы, включая млекопитающих, разработали 24-часовой автономный механизм хронометража, известный как циркадные часы (биологические часы), который позволяет предвидеть, реагировать и адаптироваться к воздействиям окружающей среды, таким как ежедневные циклы дня и ночи. Правильное функционирование часов играет ключевую роль во временной организации широкого спектра клеточных, физиологических и поведенческих процессов [9].

За прошедшее столетие границы между днём и ночью были размывы из-за широкого распространения электрических осветительных приборов в ночное время. Нарушение внутренних суточных ритмов

стало довольно распространённым явлением во всех развитых странах. Для людей и животных последствия хронического нарушения темпорального баланса из-за воздействия ночного света становятся всё более очевидными. Таким образом, свет ночью может нарушать временную адаптацию. Биологические функции точно рассчитаны по времени для оптимального функционирования: некоторые процессы происходят ночью, а другие — днём. Для некоторых животных временная организация имеет решающее значение для оптимальной физической формы и выживания. Для человека временная организация физиологии не менее важна для здоровья и хорошего самочувствия [8].

Нарушение режима сна и бодрствования (сменный график, смена часовых поясов) вызывает бессонницу, переутомление, дневную усталость, снижение работоспособности, повышенную вероятность несчастных случаев, общее недомогание и низкое качество жизни. Имеющиеся препараты выбора: мелатонин — снижает субъективные оценки смены часовых поясов, но эффективность его до конца не изучена и не ясна; снотворные средства — могут уменьшить последствия смены часовых поясов, но связаны с различными побочными эффектами, включая головную боль, головокружение, тошноту, спутанность сознания и амнезию, которые могут перевесить любые краткосрочные преимущества [5–7].

Исходя из того, что препараты выбора при коррекции светового десинхроноза зависят от многих факторов, в т. ч. от времени введения, нами была разработана технология, которая позволяет последовательно высвобождать разные субстанции в различные временные промежутки для восстановления синхронности естественных суточных ритмов [3, 4].

Целью данного исследования явилось изучение влияния экстрактов пептидной природы (ЭПП) из эпифиза-гипофиза северного оленя (*Rangifer tarandus*) и дельтасон индуцирующего пептида (ДСИП), имитируя модифицированное высвобождение препаратов, на физическую работоспособность (выносливость) самцов крыс по выполнению ими плавания до полного отказа (методика «принудительного плавания») в условиях светового десинхроноза.

Результаты и их обсуждение

В условиях обычного освещения статистически значимые изменения физической работоспособности при использовании ЭПП в двух дозах и ДСИП при курсовом введении отсутствовали по сравнению с контрольной группой.

В группе «Постоянное освещение» через 14 дней курсового введения в условиях светового десинхроноза в подгруппе животных, получавших 1-ю дозу ЭПП, наблюдалось статистически значимое увеличение работоспособности в тесте 1 на 23%, в тесте 2 — на 31%. Вторая доза ЭПП статистически значимо увеличивала у крыс физическую работоспособность в тесте 2 на 24% по сравнению с контрольной группой; в подгруппе ДСИП статистически значимые изменения физической работоспособности отсутствовали.

В группе «Постоянная темнота» через 14 дней курсового введения в условиях светового десинхроноза в подгруппе животных, получавших 1-ю дозу ЭПП, статистически значимые изменения физической работоспособности не наблюдались. Вторая доза ЭПП статистически значимо увеличивала у крыс физическую работоспособность в тесте 2 на 26%, в подгруппе ДСИП — на 32%, по сравнению с контрольной группой.

В условиях обычного освещения через 14 дней после прекращения введения исследуемых препаратов у животных, получавших 1-ю дозу ЭПП, статистически значимые изменения физической работоспособности отсутствовали. Вторая доза ЭПП статистически значимо увеличивала у крыс физическую работоспособность в тесте 2 на 20%, а ДСИП в тесте 2 — на 36% по сравнению с контрольной группой.

В группе «Постоянное освещение» через 14 дней после окончания курсового введения в условиях светового десинхроноза в подгруппе животных, получавших 1-ю и 2-ю дозу ЭПП, статистически значимые изменения физической работоспособности не наблюдались. В подгруппе ДСИП наблюдалось статистически значимое увеличение работоспособности в тесте 2 на 21% по сравнению с контрольной группой.

В группе «Постоянная темнота» через 14 дней после окончания курсового

введения в условиях светового десинхрониза в подгруппе животных, получавших 1-ю дозу ЭПП, у крыс статистически значимо увеличивалась физическая работоспособность в тесте 2 на 18%. Вторая доза ЭПП статистически значимо увеличивала у крыс физическую работоспособность в тесте 2 на 29%; в подгруппе ДСИП в тесте 1 — на 47%, а в тесте 2 — на 30% по сравнению с контрольной группой.

Значительное увеличение физической работоспособности, выявленное в результате экспериментального исследования, может быть связано антиоксидантными эффектами исследуемых препаратов, описанными в ранее проведенных исследованиях [1, 2].

Выводы

1. Через 14 дней курсового интраназального введения при разных условиях светового режима все тестируемые средства позитивно влияли на физическую работоспособность самцов крыс, увеличивая длительность первого плавания по сравнению с контролем в среднем на 20–30%. Более эффективной на первом этапе эксперимента оказалась 1-я доза ЭПП в режиме «Постоянное освещение», статистически

достоверно увеличивая физическую работоспособность самцов крыс на 23%. Также 1-я и 2-я доза статистически значимо увеличивали длительность второго плавания в режиме «Постоянное освещение» по сравнению с контролем на 24–31%, а в режиме «постоянная темнота» 2-я доза — на 26%, ДСИП — на 32%.

2. Через 14 дней после окончания курсового интраназального введения при разных условиях светового режима все тестируемые средства также позитивно влияли на физическую работоспособность самцов крыс, увеличивая длительность первого плавания по сравнению с контролем в среднем на 20–50%. Более эффективным на первом этапе эксперимента оказался ДСИП в режиме «Постоянная темнота», статистически достоверно увеличивая выносливость на 47%. Также 2-я доза и ДСИП статистически значимо увеличивали длительность второго плавания в режиме «Обычное освещение» по сравнению с контролем на 20 и 36% соответственно, в режиме «Постоянная освещенность» — ДСИП на 21%, в режиме «Постоянная темнота»: 1-я доза — на 18%, 2-я доза — на 29% и ДСИП — на 30%, что свидетельствует об их пролонгированном действии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Батоцыренова Е.Г., Кашуро В.А., Шарабанов А.В., Козлов В.К., Коваленко А.Л. Эффективность пептидного продукта из гипофиза северного оленя в качестве антиоксидантного средства при сочетанном воздействии светового десинхрониза и депримирующего токсиканта. *Антибиотики и химиотерапия*. 2021;66(7–8):20–29. [Batotsyrenova E.G., Kashuro V.A., Sharabanov A.V., Kozlov V.K., Kovalenko A.L. Effektivnost' peptidnogo produkta iz gipofiza severnogo olenya v kachestve antioksidantnogo sredstva pri sochetannom vozdeystvii svetovogo desinkhroniza i depirmiruyushchego toksikanta [The effectiveness of a peptide product from the pituitary gland of reindeer as an antioxidant agent under the combined effects of light desynchronization and a depressant toxicant]. *Antibiotics and Chemotherapy*. 2021;66(7–8):20–29. (In Russian)]. DOI: 10.37489/0235-2990-2021-66-7-8-20-29
2. Батоцыренова Е.Г., Мельникова М.В., Бельская А.В., Иванов Д.О., Кашуро В.А., Красникова Е.Н., Шарабанов А.В. Влияние пептидного экстракта из гипофиза Северного оленя на когнитивные функции крыс при изменении светового режима. *Педиатр*. 2023;14(3):87–96. [Batotsyrenova E.G., Melnikova M.V., Belskaya A.V., Ivanov D.O., Kashuro V.A., Krasnikova E.N., Sharabanov A.V. Vliyanie peptidnogo ekstrakta iz gipofiza Severnogo olenya na kognitivnye funktsii krysa pri izmenenii svetovogo rezhima [The effect of a peptide extract from the pituitary gland of Reindeer on the cognitive functions of rats when changing the light regime]. *Pediatrician*. 2023;14(3):87–96. (In Russian)]. DOI: 10.17816/PED14387-96
3. Кашуро В.А., Батоцыренова Е.Г., Степанов С.В., Швецов А.В., Скоморохова Е.Б. К вопросу фармакологической коррекции десинхрониза. *Экспериментальная и клиническая фар-*

- макология. 2017;80(S6):15–16. [Kashuro V.A., Batotsyrenova Ye.G., Stepanov S.V., Shvetsov A.V., Skomorokhova Ye.B. K voprosu farmakologicheskoy korrektsii desinkhronoza [On the issue of pharmacological correction of desynchronization]. *Experimental and Clinical Pharmacology*. 2017;80(S6):15–16. (In Russian)].
4. Шарабанов А.В., Батоцыренова Е.Г., Кашуро В.А., Гасанов М.Т., Комов Ю.В. Антиоксидантный эффект экстрактов пептидной природы с модифицированным высвобождением при световом десинхронозе. *Биомедицина*. 2022;18(3):50–57. [Sharabanov A.V., Batotsyrenova E.G., Kashuro V.A., Gasanov M.T., Komov Yu.V. Antioksidantnyy efekt ekstraktov peptidnoy prirody s modifitsirovannym vysvobozhdeniem pri svetovom desinkhronoze [Antioxidant effect of peptide extracts with modified release in light desynchronization]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2022;18(3):50–57. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-18-3-50-57
 5. Швецов А.В., Батоцыренова Е.Г., Дюжикова Н.А., Кашуро В.А., Лапина Н.В., Долго-Сабуров В.Б., Иванов М.Б. Исследование сочетанного воздействия тиопентала натрия и дельта-сон индуцирующего пептида на антиоксидантную систему крыс. *Токсикологический вестник*. 2016;(5):49–52. [Shvetsov A.V., Batotsyrenova Ye.G., Dyuzhikova N.A., Kashuro V.A., Lapina N.V., Dolgo-Saburov V.B., Ivanov M.B. Issledovanie sochetanogo vozdeystviya tiopentala natriya i del'ta-son indutsiruyushchego peptida na antioksidantnyuyu sistemu krys [Study of the combined effects of sodium thiopental and delta-sleep-inducing peptide on the antioxidant system of rats]. *Toksikologicheskiiy vestnik [Toxicological Bulletin]*. 2016;(5):49–52. (In Russian)]. DOI: 10.36946/0869-7922-2016-5-49-52
 6. Herxheimer A. Jet lag. *BMJ Clin. Evid*. 2014;2014:2303.
 7. Jang T.W. Work-fitness evaluation for shift work disorder. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2021;18(3):1294. DOI: 10.3390/ijerph18031294
 8. Nelson R.J., Chbeir S. Dark matters: Effects of light at night on metabolism. *Proc. Nutr. Soc.* 2018;77(3):223–229. DOI: 10.1017/S0029665118000198
 9. Yalcin M., Mundorf A., Thiel F., Amatriain-Fernández S., Kalthoff I.S., Beucke J.C., Budde H., Garthus-Niegel S., Peterburs J., Relógio A. It's about time: The circadian network as time-keeper for cognitive functioning, locomotor activity and mental health. *Front. Physiol*. 2022;13:873237. DOI: 10.3389/fphys.2022.873237

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Шарабанов Андрей Вячеславович*, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России»;
e-mail: avsharabanov@gmail.com

Батоцыренова Екатерина Геннадьевна, к.б.н., доц., ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии им. академика С.Н. Голикова ФМБА России», ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России;
e-mail: bkaterina2009@yandex.ru

Кашуро Вадим Анатольевич, д.м.н., доц., ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России, ФГБОУ ВО «Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена», ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»;
e-mail: kashuro@yandex.ru

Andrey V. Sharabanov*, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: avsharabanov@gmail.com

Ekaterina G. Batotsyrenova, Cand. Sci. (Biol.), Assoc. Prof., Golikov Research Center of Toxicology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia, Saint Petersburg State Pediatric Medical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: bkaterina2009@yandex.ru

Vadim A. Kashuro, Dr. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Saint Petersburg State Pediatric Medical University of the Ministry of Health Care of Russia, Herzen Russian State Pedagogical University, Saint Petersburg State University;
e-mail: kashuro@yandex.ru

Гасанов Мелик Тофикович, к.м.н., доц.,
ФГБУН «Научный центр биомедицинских тех-
нологий Федерального медико-биологического
агентства России»;

e-mail: m.gasanov@scbmt.ru

Melik T. Gasanov, Cand. Sci. (Med.), Assoc.
Prof., Scientific Center of Biomedical Technologies
of the Federal Medical and Biological Agency
of Russia;

e-mail: m.gasanov@scbmt.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

БИОМОДЕЛИРОВАНИЕ ДЕКОМПРЕССИОННОЙ БОЛЕЗНИ У КРЫС

А.В. Бервинова^{1,2,*}, В.А. Паликов^{1,2}, И.А. Дьяченко^{1,2}, Р.Р. Амиров³, Н.Б. Павлов³,
А.Т. Логунов⁴, А.Н. Мурашёв^{1,2}

¹ Пушчинский филиал ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет»
142290, Московская обл., Пушкино, просп. Науки, 3

² Филиал ФГБУН «ГНЦ РФ Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН
142290, Московская обл., Пушкино, просп. Науки, 6

³ ФГБУН «ГНЦ РФ Институт медико-биологических проблем» РАН
123007, Москва, Хорошёвское ш., 76а

⁴ ЗАО «Специальное конструкторское бюро экспериментального оборудования
при Институте медико-биологических проблем РАН»
141400, Московская обл., Химки, Васьютинское ш., 1, корп. 1

Исследование декомпрессионной болезни на животных является важным направлением в научной области гипербарической медицины. Декомпрессионная болезнь — это серьёзное заболевание, которое может возникнуть у людей при внезапном переходе из условий высокого давления, например при погружении вглубь воды, к условиям низкого давления, как при всплывании. Понимание механизмов возникновения и развития данного заболевания у животных может помочь улучшить методики профилактики и лечения у людей. В данном исследовании были изучены разные скорости декомпрессии при 60- и 30-минутной экспозиции на грунте, определена частота появления декомпрессионной болезни у животных и процент выживаемости.

Ключевые слова: химиоиндуцированная периферическая нейропатия, периферические полинейропатии, токсические полинейропатии, противоопухолевые средства

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Бервинова А.В., Паликов В.А., Дьяченко И.А., Амиров Р.Р., Павлов Н.Б., Логунов А.Т., Мурашёв А.Н. Биомоделирование декомпрессионной болезни у крыс. *Биомедицина*. 2024;20(3E):135–139. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-135-139>

Поступила 15.04.2024

Принята после доработки 22.07.2024

Опубликована 01.11.2024

BIOMODELING OF DECOMPRESSION SICKNESS IN RATS

Arina V. Bervinova^{1,2,*}, Viktor A. Palikov^{1,2}, Igor A. Dyachenko^{1,2}, Rustam R. Amirov³,
Nikolay B. Pavlov³, Aleksey T. Logunov⁴, Arkadiy N. Murahsev^{1,2}

¹ Pushchino Branch of the Russian Biotechnological University
142290, Russian Federation, Moscow Region, Pushchino, Nauki Ave., 3

² Branch of the Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry
of the Russian Academy of Sciences
142290, Russian Federation, Moscow Region, Pushchino, Nauki Ave., 6

³ Institute of Medical and Biological Problems of the Russian Academy of Sciences
123007, Russian Federation, Moscow, Khoroshevskoe Highway, 76A

⁴ Special Design Bureau for Experimental Equipment at the Institute
of Medical and Biological Problems of the Russian Academy of Sciences
141400, Russian Federation, Moscow Region, Khimki, Vashutinskoe Highway, 1

The study of decompression sickness in animals is an important area of research in the field of hyperbaric medicine. Decompression sickness is a serious condition that can occur in humans when there is a sudden transition from high-pressure conditions, such as when diving deep into water, to low-pressure conditions, such as when surfacing. Understanding the mechanisms of the onset and development of this disease in animals can help improve prevention and treatment methods in humans. This study examined different decompression rates during 60 and 30 min of exposure aground, determined the incidence of decompression sickness in animals and the survival rate.

Keywords: hypoxia, decompression model, rats, experimental model

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

For citation: Bervinova A.V., Palikov V.A., Dyachenko I.A., Amirov R.R., Pavlov N.B., Logunov A.T., Murahsev A.N. Biomodeling of Decompression Sickness in Rats. *Journal Biomed.* 2024;20(3E):135–139.
<https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-135-139>

Submitted 15.04.2024

Revised 22.07.2024

Published 01.11.2024

Введение

При быстром изменении давления, например во время экстренного всплытия, в организме человека возникает патологическое состояние — декомпрессионная болезнь [2]. Декомпрессионная болезнь (ДКБ, кессонная болезнь) возникает при быстром снижении давления, в результате чего ранее растворённый в крови газ переходит в газообразное состояние, в кровеносных сосудах и тканях внутренних органов появляются пузырьки [6]. В результате данного процесса могут возникать повреждения центральной нервной системы, лёгких, сердца и других органов. Появляются такие клинические признаки, как головная боль, заложенность ушей, боль в суставах и кожные проявления. Существуют доказательства широкой межиндивидуальной вариабельности восприимчивости к декомпрессионной болезни [1]. Вероятность появления ДКБ была документирована экспериментами на животных моделях, которые предоставляют множество примеров этой

межиндивидуальной изменчивости [3, 5]. Риск образования ДКБ соотносится с количеством циркулирующих венозных газовых эмболий, образующихся во время и после декомпрессии [4]. Однако очень большое количество газовых пузырьков было зарегистрировано у дайвера без каких-либо симптомов ДКБ. Возникновение ДКБ зависит от множества физиологических переменных, и очень важно воссоздать данную патологию на животных, чтобы изучить её механизмы.

Материалы и методы

В ходе исследования были использованы молодые, не спаривавшиеся самцы аутбредных крыс Sprague Dawley SPF-статуса в возрасте 9–10 недель и массой тела 239 ± 23 г. Источником животных служил НПП «Питомник лабораторных животных» ФИБХ РАН (Московская обл.). Животные содержались в виварии барьерного типа с автоматической сменой светового режима, а также с 12-кратной сменой воздушного

объёма комнаты в час. За основу стандартов содержания животных были взяты стандарты, определённые Директивой 2010/63/EU по защите животных, используемых в научных целях. В исследование были отобраны животные без клинических отклонений. В клетке размером 1820 см² размещались по 4 крысы.

Для моделирования ДКБ была использована экспериментальная барокамера «Мышка 2» с поддержанием давления 100 м водного столба, сконструированная на базе ЗАО «СКБ при медико-биологических проблем РАН». Камера вместимостью до 6 крыс, объёмом 22,6 л, оснащена датчиками температуры и влажности. Моделирование ДКБ проводилось за счёт подачи воздуха в барокамеру, скорость повышения давления для всех групп составляла 20 м/мин.

Для подбора условий с видимыми клиническими проявлениями ДКБ животные были поделены на пять групп:

- 1-я группа: время экспозиции на грунте — 60 мин, скорость декомпрессии — 15 м/мин;
- 2-я группа: время экспозиции на грунте — 60 мин, скорость декомпрессии — 10 м/мин;

– 3-я группа: время экспозиции на грунте — 30 мин, скорость декомпрессии — 15 м/мин;

– 4-я группа: время экспозиции на грунте — 30 мин, скорость декомпрессии — 10 м/мин;

– 5-я группа: время экспозиции на грунте — 30 мин, скорость декомпрессии — 8 м/мин.

Результаты исследований

Процент гибели животных, а также процент животных с видимыми симптомами ДКБ показан на рисунке.

При экспозиции на грунте 60 мин и скорости всплытия 15 м/мин в течение 3–4 мин погибли все животные. При скорости в 10 м/мин погибло 3 из 4 крыс (75%) в течение этого же времени. При данных режимах экстренного всплытия у всех животных наблюдалась одышка и нарушение двигательной функции передних и задних конечностей, а также частое почёсывание. После гибели животных проводилось экстренное вскрытие для макроскопического осмотра внутренних органов. В кровеносном русле животных наблюдалось значительное количество больших пузырей («закипание» крови). Повреждение лёгких сопровожда-

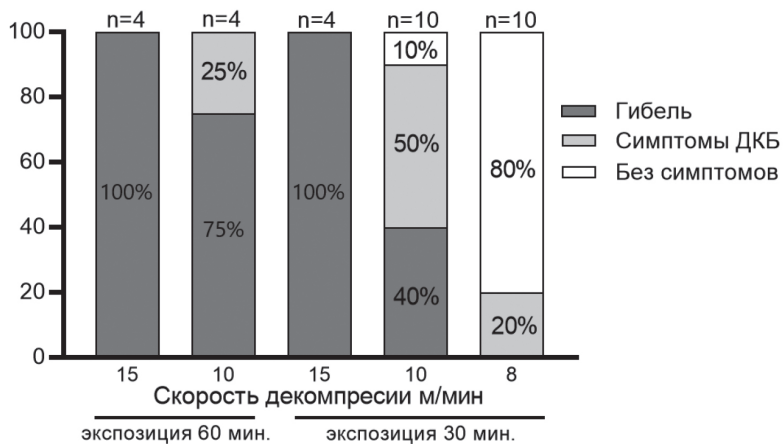


Рис. Частота возникновения декомпрессионной болезни.
Fig. Frequency of decompression sickness.

лось изменением цвета на тёмно-красный, напоминая геморрагический отёк лёгких, жировая ткань — с инфильтрацией клетками крови.

При изменении времени нахождения на грунте до 30 мин и скорости декомпрессии в 15 м/мин в первый час произошла гибель всех животных. Выживаемость животных удалось повысить на скорости 10 и 8 м/мин. В первом случае гибель животных в группе составила 40% в течение суток. При вскрытии были обнаружены повреждения лёгких, а также кровоизлияния в жировой ткани.

У 50% животных наблюдались клинические признаки ДКБ (параплегия, одышка, почёсывание). При всплытии со скоростью 8 м/мин выживаемость группы составляла 100%, из которых только у 20% животных наблюдались симптомы ДКБ.

Выводы

Для изучения последствий декомпрессионной болезни наиболее адекватным режимом моделирования является 4-я группа: время экспозиции на грунте — 30 мин, скорость декомпрессии — 10 м/мин.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Berghage T.E., Woolley J.M., Keating L.J. The probabilistic nature of decompression sickness. *Undersea Biomed.* 1974;1(2):189–196.
2. Butler B.D., Hills B.A. The lung as a filter for microbubbles. *J. Appl. Physiol. Environ. Exerc. Physiol.* 1979;47(3):537–543. DOI: 10.1152/jappl.1979.47.3.537
3. Buzzacott P., Lambrechts K., Mazur A., Wang Q., Papadopoulou V., Theron M., Balestra C., Guerrero F. A ternary model of decompression sickness in rats. *Comput. Biol. Med.* 2014;55:74–78. DOI: 10.1016/j.combiomed.2014.10.012
4. Eftedal O.S., Lydersen S., Brubakk A.O. The relationship between venous gas bubbles and adverse effects of decompression after air dives. *Undersea Hyperb. Med.* 2007;34(2):99–105.
5. Lillo R.S., Parker E.C. Mixed-gas model for predicting decompression sickness in rats. *J. Appl. Physiol.* 2000;89(6):2107–2116. DOI: 10.1152/jappl.2000.89.6.2107
6. Vann R.D., Butler F.K., Mitchell S.J., Moon R.E. Decompression illness. *Lancet.* 2011;377(9760):153–164. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)61085-9

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Бервинова Арина Владимировна*, Пушкинский филиал ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет», Филиал ФГБУН «ГНЦ РФ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН;
e-mail: bervinova@bibch.ru

Паликов Виктор Анатольевич, Пушкинский филиал ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет», Филиал ФГБУН «ГНЦ РФ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН;
e-mail: vpalikov@bibch.ru

Arina V. Bervinova*, Pushchino Branch of the Russian Biotechnological University, Branch of the Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: bervinova@bibch.ru

Viktor A. Palikov, Pushchino Branch of the Russian Biotechnological University, Branch of the Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: vpalikov@bibch.ru

Дьяченко Игорь Александрович, к.б.н., доц.,
Пушкинский филиал ФГБОУ ВО «Российский
биотехнологический университет», Филиал
ФГБУН «ГНЦ РФ Институт биоорганиче-
ской химии им. академиков М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова» РАН;
e-mail: dyachenko@bibch.ru

Амиров Рустам Рафаэльевич, ФГБУН «ГНЦ
РФ Институт медико-биологических проблем»
РАН;
e-mail: osvod7@bk.ru

Павлов Николай Борисович, к.м.н., доц.,
ФГБУН «ГНЦ РФ Институт медико-биологиче-
ских проблем» РАН;
e-mail: bobvodolaz@yandex.ru

Логунов Алексей Тимофеевич, ЗАО «Специ-
альное конструкторское бюро эксперимен-
тального оборудования при Институте медико-
биологических проблем РАН»;
e-mail: a.t.logunov@yandex.ru

Мурашёв Аркадий Николаевич, д.б.н., проф.,
Пушкинский филиал ФГБОУ ВО «Российский
биотехнологический университет», Филиал
ФГБУН «ГНЦ РФ Институт биоорганиче-
ской химии им. академиков М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова» РАН;
e-mail: murashev@bibch.ru

Igor A. Dyachenko, Cand. Sci. (Biol.), Assoc. Prof.,
Pushchino Branch of the Russian Biotechnological
University, Branch of the Shemyakin and Ov-
chinnikov Institute of Bioorganic Chemistry
of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: dyachenko@bibch.ru

Rustam R. Amirov, Institute of Medical
and Biological Problems of the Russian Academy
of Sciences;
e-mail: osvod7@bk.ru

Nikolay B. Pavlov, Cand. Sci. (Med.), Assoc.
Prof., Institute of Medical and Biological Problems
of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: bobvodolaz@yandex.ru

Aleksey T. Logunov, Special Design Bureau
for Experimental Equipment at the Institute
of Medical and Biological Problems of the Russian
Academy of Sciences;
e-mail: a.t.logunov@yandex.ru

Arkadiy N. Murahsev, Dr. Sci. (Biol.), Prof.,
Pushchino Branch of the Russian Biotechnological
University, Branch of the Shemyakin and Ov-
chinnikov Institute of Bioorganic Chemistry
of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: murashev@bibch.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

ПРИМЕНЕНИЕ ГИПЕРОКСИЧЕСКОЙ ПОДОГРЕТОЙ ГЕЛИЙ-КИСЛОРОДНОЙ СМЕСИ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ АРТЕРИАЛЬНОЙ ВОЗДУШНОЙ ЭМБОЛИИ

В.А. Паликов^{1,2,*}, Н.Б. Павлов^{3,4}, Р.Р. Амиров^{3,4}, А.М. Исмаилова¹, С.О. Афанасьева²,
Е.С. Михайлов^{1,2}, А.В. Бервинова^{1,2}, И.А. Дьяченко^{1,2}, А.Т. Логунов⁴, А.Н. Мурашёв^{1,2}

¹ Филиал ФГБУН ГНЦ РФ Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН
142290, Российская Федерация, Московская обл., Пущино, просп. Науки, 6

² Пущинский филиал ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет»
142290, Московская обл., Пущино, просп. Науки, 3

³ ФГБУН ГНЦ РФ Институт медико-биологических проблем РАН
123007, Москва, Хорошёвское ш., 76А

⁴ ЗАО «Специальное конструкторское бюро экспериментального оборудования
при Институте медико-биологических проблем РАН»
141400, Московская обл., Химки, Вашутинское ш., 1, корп. 1

Причинами артериальной газовой эмболии могут быть как осложнения медицинских и хирургических процедур, так и прямое попадание воздуха в большой круг кровообращения в результате нарушения целостности альвеолярно-капиллярного барьера. Данная патология опасна для жизни и требует быстрого вмешательства, т. к. воздух в артериальном кровообращении может привести к ишемии органов. В данной работе мы продемонстрировали эффективность применения подогретой гипероксической кислородно-гелиевой смеси при церебральной артериальной воздушной эмболии. Оксигенотерапия в нормобарических условиях не влияла на исход артериальной воздушной эмболии. Непрерывный ингаляционный сеанс в течение 30 мин или интервальный ингаляционный сеанс 3 раза по 5 мин устраняли очаги ишемического инсульта у крыс.

Ключевые слова: экспериментальная модель, воздушная эмболия, инсульт, кислородно-гелиевая смесь, крысы

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Паликов В.А., Павлов Н.Б., Амиров Р.Р., Исмаилова А.М., Афанасьева С.О., Михайлов Е.С., Бервинова А.В., Дьяченко И.А., Логунов А.Т., Мурашёв А.Н. Применение гипероксической подогретой гелий-кислородной смеси в экспериментальной модели церебральной артериальной воздушной эмболии. *Биомедицина*. 2024;20(3E):140–146. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-140-146>

Поступила 15.04.2024

Принята после доработки 22.07.2024

Опубликована 01.11.2024

USE OF A HYPEROXIC HEATED HELIUM-OXYGEN MIXTURE IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF CEREBRAL ARTERIAL AIR EMBOLISM

Viktor A. Palikov^{1,2,*}, Nikolay B. Pavlov^{3,4}, Rustam R. Amirov^{3,4}, Alina M. Ismailova¹,
Sofia O. Afanasyeva², Evgeniy S. Mikhailov^{1,2}, Arina V. Bervinova^{1,2}, Igor A. Dyachenko^{1,2},
Aleksey T. Logunov⁴, Arkadiy N. Murashev^{1,2}

¹ Branch of the Shemyakin and Ovchinnikov Institute
of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences
142290, Russian Federation, Moscow Region, Pushchino, Nauki Ave., 6

² Pushchino Branch of the Russian Biotechnological University
142290, Russian Federation, Moscow Region, Pushchino, Nauki Ave., 3

³ Institute of Medical and Biological Problems of the Russian Academy of Sciences
123007, Russian Federation, Moscow, Khoroshevskoe Highway, 76A

⁴ Special Design Bureau for Experimental Equipment at the Institute of Medical
and Biological Problems of the Russian Academy of Sciences
141400, Russian Federation, Moscow Region, Khimki, Vashutinskoe Highway, 1

Arterial gas embolism can result from complications related to medical and surgical procedures, as well as a direct entry of air into the systemic circulation due to the disruption of the alveolar-capillary barrier. Since air in the arterial circulation can lead to organ ischemia, this life-threatening pathology requires prompt intervention. In this study, we demonstrated the effectiveness of using a hyperoxic heated helium-oxygen mixture in cerebral arterial air embolism. Oxygen therapy under normobaric conditions did not affect the outcome of arterial air embolism. A continuous inhalation session for 30 min, or intermittent inhalation sessions 3 times for 5 min each, eliminated foci of ischemic stroke in rats.

Keywords: experimental model, air embolism, stroke, oxygen-helium mixture, rats

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

For citation: Palikov V.A., Pavlov N.B., Amirov R.R., Ismailova A.M., Afanasyeva S.O., Mikhailov E.S., Bervinova A.V., Dyachenko I.A., Logunov A.T., Murashev A.N. Use of a Hyperoxic Heated Helium-Oxygen Mixture in an Experimental Model of Cerebral Arterial Air Embolism. *Journal Biomed.* 2024;20(3E):134–146. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-140-146>

Submitted 15.04.2024

Revised 22.07.2024

Published 01.11.2024

Введение

Причинами артериальной воздушной эмболии (АВЭ) могут быть как осложнения медицинских и хирургических процедур, так и прямое попадание воздуха в большой круг кровообращения в результате нарушения целостности альвеоларно-капиллярного барьера [3]. Неспецифический характер признаков и симптомов сосудистой воздушной эмболии не позволяют поставить диагноз. Тяжесть симптомов воздушной эмболии варьируется в зависимости от количества воздуха и конечного расположения воздушного пузыря. Попадание эмбола в сонные и коронарные артерии может вызвать немедленный инсульт или симптомы сердечно-сосудистых заболеваний [4]. Цереброваскулярные окклюзии, вызванные воздушной эмболией,

чувствительны ко времени, что требует альтернативной стратегии неотложного лечения и реперфузии.

Основное лечение воздушной эмболии включает в себя гипербарическую оксигенацию, которая работает за счёт сжатия газа под давлением, что позволяет вывести эмбол через лёгкие естественным путём [6]. Однако недостатком этого метода является низкая доступность барокомплексов. Именно поэтому оксигенотерапия является на данный момент единственным возможным вариантом экстренной терапии при данной патологии [10]. Создавая резкий градиент концентрации газов между кровью и альвеолами, ускоряется вымывание азота из крови через лёгкие. Дыхание 100% кислородом используется во время транспортировки пострадавшего.

Одной из перспективных газовых смесей для экстренной терапии воздушных эмболий является кислородно-гелиевая смесь (КГС). КГС обладает важным клеточным защитным действием в организме [7]. Было показано, что КГС уменьшает объем инфаркта на животной модели очаговой церебральной ишемии-реперфузии [9], уменьшает повреждения клеток на модели черепно-мозговой травмы *in vitro* [1]. Вполне возможно, что эти нейропротекторные эффекты КГС могут иметь не меньшее значение при лечении внутрисосудистой воздушной эмболии.

Основной **целью** нашего исследования стало изучение влияния непрерывной 30-минутной ингаляции КГС и интервальной ингаляции КГС три раза по 5 мин на очаги ишемического инсульта крыс при церебральной АВЭ. Дополнительно была поставлена задача о проведении сравнения с классической терапией 100% кислородом.

Материалы и методы

В исследованиях принимали участие 24 самца крыс SD в возрасте 8–10 недель SPF-статуса. Животные были получены из НПП «Питомник лабораторных животных» ИБХ РАН (Московская обл.). Все процедуры с животными в исследовании были рассмотрены и утверждены Институтской биоэтической комиссией.

Перед моделированием АВЭ проводилась катетеризация внутренней сонной артерии. Катетеризация животных проходила под общей инъекционной анестезией (Телазол®, 30 мг/кг / Ксила®, 10 мг/кг). Через сутки после катетеризации моделировали АВЭ. Животное помещалось в домик-фиксатор в бодрствующем состоянии. К катетеру, выведенному на холку крысы, подключали шприц, заполненный воздухом и установленный в инфузомат. Скорость подачи воздуха через катетер составля-

ла 10 мкл/мин, объем воздуха — 100 мкл на животное.

В зависимости от применяемой терапии после АВЭ животные были разделены на 4 группы по 6 животных: группа 1 — животные не подвергались терапии; группа 2 — непрерывная ингаляция 100% медицинским кислородом в течение 30 мин непосредственно после моделирования АВЭ (производитель медицинского кислорода — ООО «Ковровский газовый завод», Россия); группа 3 — непрерывная ингаляция подогретой КГС (32% O₂ / 68% He) в течение 30 мин, непосредственно после моделирования АВЭ (производитель — ЗАО «СКБ ЭО при ИМБП РАН», Россия); группа 4 — интервальная ингаляция подогретой КГС (32% O₂ / 68% He), три раза по 5 мин с 5-минутными периодами отмены, непосредственно после моделирования АВЭ (производитель — ЗАО «СКБ ЭО при ИМБП РАН», Россия).

Через 24 ч после моделирования АВЭ все животные были подвергнуты эвтаназии путем анестезии (Телазол®, 30 мг/кг / Ксила®, 10 мг/кг) с последующим терминальным взятием крови. Мозг извлекали и нарезали на фронтальные срезы толщиной 2 мм. Срезы помещали в 1% р-р 2,3,5-трифенилтетразолия хлорида (ТТХ). Окраску проводили при 37°C в течение 10–12 мин. На окрашенных срезах оценивали наличие или отсутствие очагов поражения головного мозга с помощью фоторегистрации.

Результаты исследований

Сразу после эмболизации у животных в течение первых минут наблюдалась неконтролируемая гиперактивность, после которой крысы принимали лежачее положение, прослеживалась одышка. Применение кислорода или подогретой дыхательной КГС приводило к улучшению самочувствия. Однако спустя сутки крысы без терапии и с применением кислорода демонстрировали характерные признаки односторонней

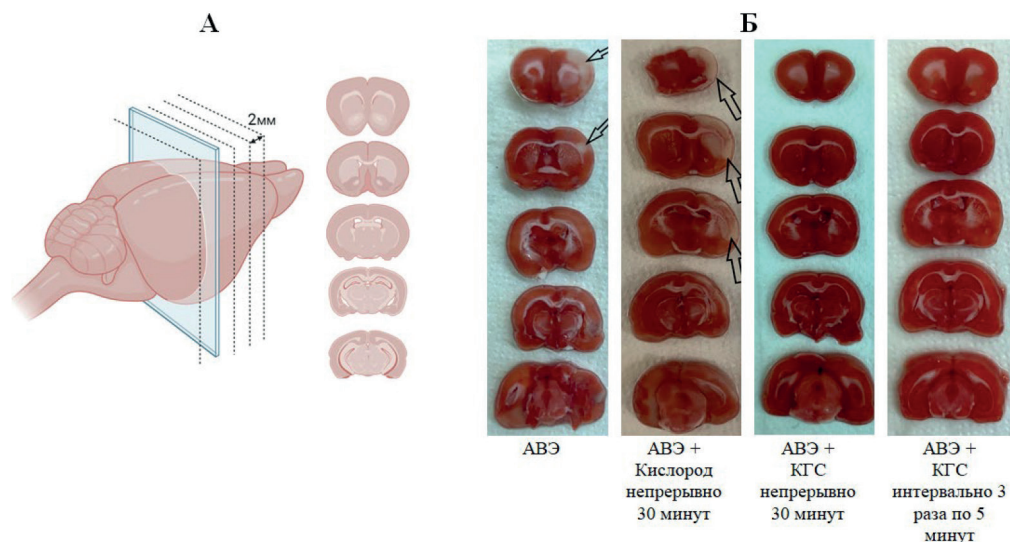


Рис. Фронтальные срезы головного мозга крыс спустя 24 ч после АВЭ: А — схематичное изображение срезов; Б — фронтальные срезы головного мозга экспериментальных групп. Стрелками указаны очаги некротических изменений, выявленных с помощью окрашивания ТТХ.

Fig. Frontal sections of the rat brain 24 h after arterial air embolism: А — schematic representation of sections; Б — frontal sections of the brain of the experimental groups. Arrows indicate foci of necrotic changes revealed by 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride staining.

ишемии головного мозга, а именно хождение по часовой стрелке, дискоординация и заваливание на бок при резком развороте.

При некропсии и окрашивании органов ТТХ у животных из группы без терапии и из группы с применением оксигенотерапии наблюдались фокальные очаги некроза, расположенные в правом полушарии головного мозга (рис.). У животных из групп с применением подогретой КГС — как непрерывно, так и интервально — подобных поражений не выявлено.

Обсуждение результатов

В нашем исследовании использован воздушный эмбол, который имеет пространство между внешней оболочкой пузырька и сосудом, позволяющее осуществлять продолжительную микроперфузию, что является отличительной чертой воздушной эмболии от тромбоземболии [5]. Несмотря на эти особенности, введение

100 мкл воздуха в общий ствол сонной артерии бодрствующим крысам приводит к фокальному инсульту, который был визуализирован при помощи окрашивания ТТХ. Применение кислорода может оказывать сочетанное воздействие при данной патологии — во-первых, прямое антигипоксическое действие, во-вторых, увеличение напряжения O_2 в крови должно облегчать вымывание азота из пузырьков воздуха, т. к. парциальное давление азота в лёгких будет уменьшено.

Применение КГС при аналогичном времени ингаляционного сеанса позволило устранить последствия ишемизации головного мозга. На первый взгляд, оксигенотерапия и КГС должны иметь общий механизм действия, однако эффективность кислорода в нашем исследовании уступает терапевтическому эффекту КГС при АВЭ. Не исключаем, что увеличение времени ингаляции кислородом может быть эффективным.

Одно из объяснений состоит в том, что КГС вводится в биохимический путь, который предотвращает гибель клеток [8]. Это происходит на пути фосфатидилинозитол-3-киназы, что приводит к активации протеинкиназы B, которая, в свою очередь, фосфорилирует GSK-3b и BAD («промотор смерти», связанный с Bcl-2). Фосфорилирование GSK-3b и BAD может подавлять активность каспазы-3 и, тем самым, ингибировать клеточный апоптоз [2]. Ещё одним объяснением может быть то, что гелий, присутствующий в крови в газообразном состоянии, может диффундировать по градиенту концентрации в воз-

душный эмбол, вызывая дисбаланс газов внутри воздушного пузыря.

Закключение

Подогретая дыхательная кислородно-гелиевая смесь (32% кислорода и 68% гелия) предотвращает формирование ишемических поражений головного мозга при артериальной воздушной эмболии у бодрствующих крыс. Можно предположить, что данную газовую смесь возможно использовать в качестве неотложной помощи в ситуациях с риском развития внутрисудистой воздушной эмболии. Однако данная теория требует дальнейшего изучения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Coburn M., Maze M., Franks N. The neuroprotective effects of xenon and helium in an in vitro model of traumatic brain injury. *Crit. Care Med.* 2008;36(2):588–595. DOI: 10.1097/01.CCM.0B013E3181611F8A6
2. Datta S.R., Brunet A., Greenberg M.E. Cellular survival: A play in three Acts. *Genes Dev.* 1999;13(22):2905–2927. DOI: 10.1101/gad.13.22.2905
3. Gordy S., Rowell S. Vascular air embolism. *Int. J. Crit. Ill. Inj. Sci.* 2013;3(1):73–76. DOI: 10.4103/2229-5151.109428
4. Lyaker M.R., Tulman D.B., Dimitrova G.T., Pin R.H., Papadimos T.J. Arterial embolism. *Int. J. Crit. Ill. Inj. Sci.* 2013;3(1):77–87. DOI: 10.4103/2229-5151.109429
5. Marsh P.L., Moore E.E., Moore H.B., Bunch C.M., Aboukhaled M., Condon S.M. 2nd, Al-Fadhl M.D., Thomas S.J., Larson J.R., Bower C.W., Miller C.B., Pearson M.L., Twilling C.L., Reser D.W., Kim G.S., Troyer B.M., Yeager D., Thomas S.G., Srikureja D.P., Patel S.S., Añón S.L., Thomas A.V., Miller J.B., Van Ryn D.E., Pamulapati S.V., Zimmerman D., Wells B., Martin P.L., Seder C.W., Aversa J.G., Greene R.B., March R.J., Kwaan H.C., Fulkerson D.H., Vande Lune S.A., Mollnes T.E., Nielsen E.W., Storm B.S., Walsh M.M. Iatrogenic air embolism: pathoanatomy, thromboinflammation, endotheliopathy, and therapies. *Front. Immunol.* 2023;14:1230049. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1230049
6. Moon R.E. Hyperbaric oxygen treatment for air or gas embolism. *Undersea Hyperb. Med.* 2014;41(2):159–166.
7. Oei G., Weber N., Hollmann M.W., Preckel B. Cellular effects of helium in different organs. *Anesthesiology.* 2010;112(6):1503–1510. DOI: 10.1097/ALN.0b013e3181d9cb5e
8. Pagel P.S., Krolkowski J.G., Shim Y.H., Venkatapuram S., Kersten J.R., Weihs D., Warltier D.C., Pratt P.F. Jr. Noble gases without anesthetic properties protect myocardium against infarction by activating prosurvival signaling kinases and inhibiting mitochondrial permeability transition *in vivo*. *Anesth. Analg.* 2007;105(3):562–569. DOI: 10.1213/01.ane.0000278083.31991.36
9. Pan Yi., Zhang H., VanDeripe D.R., Cruz-Flores S., Panneton W.M. Heliox and oxygen reduce infarct volume in a rat model of focal ischemia. *Exp. Neurol.* 2007;205(2):587–590. DOI: 10.1016/j.expneurol.2007.03.023
10. van Hulst R.A., Klein J., Lachmann B. Gas embolism: Pathophysiology and treatment. *Clin. Physiol. Funct. Imaging.* 2003;23(5):237–246. DOI: 10.1046/j.1475-097x.2003.00505.x

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Паликов Виктор Анатольевич*, Филиал
ФГБУН ГНЦ РФ Институт биоорганиче-
ской химии им. академиков М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушкинский филиал
ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический
университет»;
e-mail: vpalikov@bibch.ru

Viktor A. Palikov*, Branch of the Shemyakin
and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry
of the Russian Academy of Sciences, Pushchino
Branch of the Russian Biotechnological University;
e-mail: vpalikov@bibch.ru

Павлов Николай Борисович, к.м.н., доц.,
ФГБУН ГНЦ РФ Институт медико-биологиче-
ских проблем РАН;
e-mail: bobvodolaz@yandex.ru

Nikolay B. Pavlov, Cand. Sci. (Med.), Assoc.
Prof., Institute of Medical and Biological Problems
of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: bobvodolaz@yandex.ru

Амиров Рустам Рафаэльевич, ФГБУН ГНЦ РФ
Институт медико-биологических проблем РАН;
e-mail: osvod7@bk.ru

Rustam R. Amirov, Institute of Medical
and Biological Problems of the Russian Academy
of Sciences;
e-mail: osvod7@bk.ru

Исмаилова Алина Магомедовна, Филиал
ФГБУН ГНЦ РФ Институт биоорганиче-
ской химии им. академиков М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова РАН;
e-mail: ismailowa.a.m@yandex.ru

Alina M. Ismailova, Branch of the Shemyakin
and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry
of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: ismailowa.a.m@yandex.ru

Афанасьева Софья Олеговна, Пушкинский фи-
лиал ФГБОУ ВО «Российский биотехнологиче-
ский университет»;
e-mail: uu@pushgu.ru

Sofia O. Afanasyeva, Pushchino Branch
of the Russian Biotechnological University;
e-mail: uu@pushgu.ru

Михайлов Евгений Сергеевич, Филиал
ФГБУН ГНЦ РФ Институт биоорганиче-
ской химии им. академиков М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушкинский филиал
ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический
университет»;
e-mail: mikhaylov@bibch.ru

Evgeniy S. Mikhailov, Branch of the Shemyakin
and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry
of the Russian Academy of Sciences, Pushchino
Branch of the Russian Biotechnological University;
e-mail: mikhaylov@bibch.ru

Бервинова Арина Владимировна, Филиал
ФГБУН ГНЦ РФ Институт биоорганиче-
ской химии им. академиков М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушкинский филиал
ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический
университет»;
e-mail: bervinova@bibch.ru

Arina V. Bervinova, Pushchino Branch
of the Shemyakin and Ovchinnikov Institute
of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy
of Sciences, Branch of the Russian Biotechnological
University;
e-mail: bervinova@bibch.ru

Дьяченко Игорь Александрович, к.б.н., доц.,
Филиал ФГБУН ГНЦ РФ Институт биооргани-
ческой химии им. академиков М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушкинский филиал
ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический
университет»;
e-mail: dyachenko@bibch.ru

Igor A. Dyachenko, Cand. Sci. (Biol.), Assoc. Prof.,
Branch of the Shemyakin and Ovchinnikov Institute
of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy
of Sciences, Pushchino Branch of the Russian
Biotechnological University;
e-mail: dyachenko@bibch.ru

Логунов Алексей Тимофеевич, ЗАО «Спе-
циальное конструкторское бюро эксперимен-
тального оборудования при Институте медико-
биологических проблем РАН»;
e-mail: a.t.logunov@yandex.ru

Aleksey T. Logunov, Special Design Bureau
for Experimental Equipment at the Institute
of Medical and Biological Problems of the Russian
Academy of Sciences;
e-mail: a.t.logunov@yandex.ru

Мурашёв Аркадий Николаевич, д.б.н., проф.,
Филиал ФГБУН ГНЦ РФ Институт биооргани-
ческой химии им. академиков М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушкинский филиал
ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический
университет»;
e-mail: murashev@bibch.ru

Arkadiy N. Murashev, Dr. Sci. (Biol.), Prof.,
Branch of the Shemyakin and Ovchinnikov Institute
of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy
of Sciences, Pushchino Branch of the Russian
Biotechnological University;
e-mail: murashev@bibch.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

МОДЕЛИРОВАНИЕ ГИПОБАРИЧЕСКОЙ И ГЕМИЧЕСКОЙ ГИПОКСИЙ

М.В. Шинелев

¹ Филиал ФГБУН ГНЦ РФ Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН
142290, Российская Федерация, Московская обл., Пущино, просп. Науки, 6

² Пущинский филиал ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет»
142290, Российская Федерация, Московская обл., Пущино, просп. Науки, 3

Исследования механизмов формирования гипоксии на самых разных уровнях — от молекулярного и клеточного к органному и системному — не прекращаются до сих пор, а в наше время также актуальна патогенетическая демонстрация нового принципа фармакологической коррекции метаболизма и дисфункции при гипоксии. В работе было выполнено моделирование гипобарической и гемической гипоксий, определены основные маркеры для оценки состояния животных. Животные модельной группы показывали статистически значимо более низкие результаты в поведенческих тестах, что подтверждает успешное моделирование. Опробованная нами модель и маркеры оценки состояния могут использоваться для определения антигипоксического эффекта действующих веществ лекарственных препаратов.

Ключевые слова: моделирование, гипобарическая гипоксия, гемическая гипоксия, мыши ICR

Конфликт интересов: автор заявил об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Шинелев М.В. Моделирование гипобарической и гемической гипоксий. *Биомедицина*. 2024;20(3E):147–150. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-147-150>

Поступила 15.04.2024

Принята после доработки 22.07.2024

Опубликована 01.11.2024

MODELING OF HYPOBARIC AND HEMIC HYPOXIA

Maxim V. Shinelev

¹ Branch of the Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry
of the Russian Academy of Sciences
142290, Russian Federation, Moscow Region, Pushchino, Nauki Ave., 6

² Pushchino Branch of the Russian Biotechnological University
142290, Russian Federation, Moscow Region, Pushchino, Nauki Ave., 3

The mechanisms of hypoxia development at various levels – from molecular and cellular to organ and systemic – continue to attract research attention. At present, the pathogenetic demonstration of a new principle of pharmacological correction of metabolism and dysfunction in hypoxia seems relevant. In this work, hypobaric and hemic hypoxia is modeled, and the main markers for assessing the condition of animals are identified. Animals from the model group showed statistically significantly lower results in behavioral tests, which confirmed the success of modeling. The tested model and the markers for assessing the condition can be used to determine the antihypoxic effect of active medicinal substances.

Keywords: modeling, hypobaric hypoxia, hemic hypoxia, ICR mice

Conflict of interest: the author declares no conflict of interest.

For citation: Shinelev M.V. Modeling of Hypobaric and Hemic Hypoxia. *Journal Biomed.* 2024;20(3E): 147–150. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-147-150>

Submitted 15.04.2024

Revised 22.07.2024

Published 01.11.2024

Введение

Гипоксия является фундаментальной особенностью, которая возникает как при физиологических явлениях, так и при патофизиологических состояниях. Хорошо известна её роль в механизме ангиогенеза, метаболизма глюкозы и пролиферации/выживания клеток [4]. Гипоксическое состояние весьма негативно влияет на протекание различных заболеваний, как, например, рассеянный склероз, рак, заболевания сердца, почек, печени, лёгких и воспалительные заболевания кишечника [1, 2].

В настоящее время на основе фундаментальных исследований в области физиологии накоплен фактический материал о механизмах гипоксического повреждения, который позволил разработать прогностические критерии гипоксии, установить последовательность развития нарушений и создать классификацию гипоксических состояний [3].

Материалы и методы

Для проведения исследования было взято 64 самца мышей линии ICR (32 мыши массой $26,4 \pm 3,1$ г в возрасте 8–10 недель и 32 мыши массой $35,8 \pm 1,9$ г в возрасте 10–12 недель). Все животные, используемые в исследованиях, выращены в НПП «Питомник лабораторных животных» ФИБХ РАН (Московская обл., г. Пущино).

Животные находились в комнате содержания в барьерной зоне лаборатории биологических испытаний ФИБХ РАН с автоматической сменой воздушного объёма комнаты.

До момента формирования групп все животные проходили период карантина сроком

до двух недель, после чего они были рассажены по 8 особей в клетку Тип-3. В качестве подстила использовался коммерческий автоклавированный подстил LIGNOCEL BK8/15 («JRS», Германия). В качестве корма использовался гранулированный корм для содержания лабораторных грызунов SNIFF RI/M-H V1534-30 (автоклавируемый), давался *ad libitum* в кормовое углубление крышки клетки. В лаборатории проводился анализ на микробиологическую контаминацию образцов корма. Животным давалась профильтрованная системой «MilliRO Millipore» водопроводная вода в стандартных питьевых поликарбонатных или полисульфоновых бутылочках со стальной крышкой и носиком, *ad libitum*. Образцы воды периодически анализировались на микробиологическое загрязнение.

Острая экзогенная гипобарическая гипоксия у мышей воспроизводилась путём понижения барометрического давления окружающего животное воздуха. Удаление воздуха производилось с помощью насоса Комовского, адаптированного для моделирования состояния гипобарической гипоксии у мышей. В ходе эксперимента животные «поднимались» на высоту со скоростью около 50 м/с до наступления агонального вдоха.

С начала «подъёма» на высоту за животными наблюдали и фиксировали следующие параметры: давление/высота поддержания позы животным; давление/высота, при котором у животного наступает судорожный синдром; давление/высота агонального дыхания; время восстановления позы при «спуске с высоты». Критерием «спуска с высоты» является появление агонального дыхания.

Гемическая гипоксия моделировалась однократным внутрибрюшинным введением нитрита натрия в дозе 150 мг/кг. Производный от нитрита натрия нитрат натрия в организме связывается с гемоглобином и окисляет двухвалентные молекулы железа до трёхвалентных, что приводит к образованию метгемоглобина, не способного выполнять функцию переноса кислорода.

Спустя 2, 6 и 24 ч после введения нитрита натрия животное помещалось на площадку «открытого поля» прибора «Multiple Activity Cage 47420» («Ugo Basile», Италия), и в течение 3 мин регистрировалась горизонтальная и вертикальная активность.

Взвешивание животных проводили на платформенных электронных весах. Масса тела регистрировалась в 1-й и 2-й дни исследования. Манипуляция была выполнена согласно СОП лаборатории биологических испытаний, рассмотренной Институтской Комиссией по контролю за со-

держанием и использованием лабораторных животных. Был рассчитан прирост массы тела относительного значения в 1-й день.

Результаты исследований

Данные, полученные при моделировании острой экзогенной гипобарической гипоксии, представлены в табл. 1.

Все животные экспериментальной группы проявляли статистически значимую меньшую двигательную активность спустя 2 ч после внутрибрюшинного введения нитрита натрия относительно контрольной группы. К 6 и 24 ч различия между группами не обнаружено (табл. 2).

Животные модельной группы, в отличие от контрольной, теряли вес на 2-й день после моделирования гипоксии (табл. 3)

Животные экспериментальной группы потребляли значительно меньше корма в сутки по сравнению с контрольной группой (табл. 4).

Таблица 1. Результаты «подъёма на высоту» с помощью насоса Комовского, $\text{Mean} \pm \text{SD}$, $n=32$

Table 1. The results of “lifting to height” using the a Komovsky pump, $\text{Mean} \pm \text{SD}$, $n=32$

Параметр	Модель гипобарической гипоксии
P поддержания позы, кгс/см ²	0,4±0,01
H поддержания позы, м	8133±319,9
P судорожного синдрома, кгс/см ²	0,26±0,01
H судорожного синдрома	12070,9±395,6
P агонального дыхания, кгс/см ²	0,24±0,01
H агонального дыхания, м	12506,3±443,1
Время восстановления, с	240±48

Примечание: P — давление, H — высота.

Note: P — pressure, H — height.

Таблица 2. Результаты теста на локомоторную активность

Table 2. Results of the locomotor activity test

Группа / Параметр	Период тестирования (после моделирования)					
	2 ч		6 ч		24 ч	
	Контроль	Модель	Контроль	Модель	Контроль	Модель
Горизонтальная активность	217,4±76,2	86,9±27,6**	332,0±83,9	266,9±81,1	302,1±71,3	284,0±77,4
Вертикальная активность	9,3±7,7	1,1±1,4*	32,4±11,1	23,0±12,6	23,6±9,7	21,3±4,0

Примечания: данные представлены как среднее арифметическое $\pm$ стандартное отклонение; * — $p<0,005$, ** — $p<0,0005$.

Notes: data are presented as mean $\pm$ standard deviation; * — $p<0.005$, ** — $p<0.0005$.

Таблица 3. Масса тела и прирост массы тела
Table 3. Body weight and body weight gain

Параметр	Контроль	Модель
День 1, г	36,1±1,5	35,5±1,7
День 2, г	37,1±1,4	33,5±1,8*
Прирост массы тела в 1–2-й дни, %	1,6±0,7*	–5,5±0,6*

Примечания: данные представлены как среднее арифметическое ± стандартное отклонение; * — $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой.

Notes: data are presented as mean ± standard deviation; * — $p < 0.05$ compared to the control group.

Таблица 4. Потребление корма
Table 4. Feed consumption

Параметр	Контроль	Модель
Потребление корма в 1–2-й дни, г/кг/сут	109,9	57,1

Заключение

В работе были смоделированы гипобарическая и гемическая гипоксии. Определены маркеры оценки состояния животных. При моделировании гипобарической модели основными параметрами были: давление/высота поддержания позы животных; давление/высота, при котором у животного наступает судорожный синдром; давление/высота агонального дыхания; время вос-

становления позы при «спуске с высоты». Критерием спуска с высоты является появление агонального дыхания. При моделировании гемической гипоксии были использованы тесты на локомоторную активность, оценка набора массы и потребления корма. Данные модели и маркеры оценки можно использовать для определения антигипоксического эффекта лекарственных препаратов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

- Гоечко А.Т. Физиологические механизмы адаптации и её фармакологическая коррекция быстродействующими адаптогенами. *Международные медицинские обзоры*. М., 1994;5:330–333. [Goechko A.T. Fiziologicheskie mekhanizmy adaptatsii i ee farmakologicheskaya korrektsiya bystrodeystvuyushchimi adaptogenami [Physiological mechanisms of adaptation and its pharmacological correction by fast-acting adaptogens] *Mezhdunarodnye meditsinskie obzory* [International Medical Reviews]. Moscow, 1994;5:330–333. (In Russian)].
- Кораблев М.В., Лукиенко П.И. *Противогипоксические средства*. Минск, Беларусь, 1976:127. [Korablev M.V., Lukienko P.I. *Protivogipoksicheskie sredstva* [Antihypoxic agents]. Minsk, Belarus Publ., 1976:127. (In Russian)].
- Макарова В.Г. Сравнительная характеристика процессов энергообразования в тканях при гипоксической и гипероксической гипоксии. *Клеточное дыхание в норме и в условиях гипоксии*. Горький, 1973:87–88. [Makarova V.G. *Sravnitel'naya kharakteristika protsessov energoobrazovaniya v tkanyakh pri gipoksicheskoy i giperoksicheskoy gipoksii*. Kletchnoe dykhanie v norme i v usloviyakh gipoksii [Comparative characteristics of energy formation processes in tissues during hypoxic and hyperoxic hypoxia. Cellular respiration in normal and hypoxic conditions]. Gor'kij, 1973:87–88. (In Russian)].
- Чеснокова Н.П. *Типовые патологические процессы*. Саратов: Изд-во Саратовского медицинского университета, 2004. [Chesnokova N.P. *Tipovye patologicheskie protsessy* [Typical pathological processes]. Saratov: Izd-vo Saratovskogo meditsinskogo universiteta, 2004:400. (In Russian)].

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРЕ | INFORMATION ABOUT THE AUTHOR

Шинелев Максим Викторович, Филиал ФГБУН ГНЦ РФ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пущинский филиал ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет»; e-mail: maxsim99@inbox.ru

Maxim V. Shinelev, Branch of the Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Pushchino Branch of the Russian Biotechnological University; e-mail: maxsim99@inbox.ru

ИЗУЧЕНИЕ ГИПОГЛИКЕМИЗИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ КОМБИНАЦИЙ МАЛОБЕНА С СИНТЕТИЧЕСКИМИ ПРОТИВОДИАБЕТИЧЕСКИМИ ПРЕПАРАТАМИ НА СТРЕПТОЗОЦИНОВОЙ МОДЕЛИ САХАРНОГО ДИАБЕТА

Н.А. Анисимова, А.О. Ежова*

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

197376, Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 14, лит. А

Представлены результаты исследования по изучению гипогликемизирующей активности фармацевтической субстанции 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоат натрия (малобен) в комбинациях с метформин, противодиабетическим препаратом класса бигуанидов, и эмпаглифлозином, ингибитором натрий-зависимого переносчика глюкозы 2-го типа (SGLT 2) в почках, на фоне стрептозоциновой модели сахарного диабета в сочетании с высокожировой диетой на самцах лабораторных аутбредных крыс. Использование высокожировой диеты позволяет моделировать состояние преддиабета и повысить эффективность от введения стрептозоцина, после инъекции которого наблюдается увеличение уровня глюкозы в крови и моче животных и диуреза, что свидетельствует о развитии патологии, приближенной к реальному сахарному диабету 2-го типа. В рамках исследования анализировалась динамика изменения глюкозы в крови и моче, суточного диуреза, массы тела животных.

Ключевые слова: малобен, стрептозоцин, доклинические испытания, метформин, эмпаглифлозин, высокожировая диета

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: исследование выполнено с использованием оборудования ЦКП «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России» в рамках соглашения № 075-15-2021-685 от 26.07.2021 г. при финансовой поддержке Минобрнауки России.

Для цитирования: Анисимова Н.А., Ежова А.О. Изучение гипогликемизирующей активности комбинаций малобена с синтетическими противодиабетическими препаратами на стрептозоциновой модели сахарного диабета. *Биомедицина*. 2024;20(3E):151–155. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-151-155>

Поступила 15.04.2024

Принята после доработки 05.08.2024

Опубликована 01.11.2024

STUDYING THE HYPOGLYCEMIC ACTIVITY OF COMBINATIONS OF MALOBEN WITH SYNTHETIC ANTIDIABETIC DRUGS ON A STREPTOZOICIN MODEL OF DIABETES MELLITUS

Natalya A. Anisimova, Alexandra O. Ezhova*

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

In this paper, we study the hypoglycemic activity of the 4,4'-(propanediamido)dibenzoate sodium (maloben) pharmaceutical substance in combination with metformin, an antidiabetic drug of the biguanide class, and empagliflozin, an inhibitor of sodium-dependent glucose transporter type 2 (SGLT2) in the kidneys, in the setting of a streptozocin model of diabetes mellitus in combination with a high-fat diet in laboratory outbred male rats. The use of a high-fat diet makes it possible to simulate the state of prediabetes and increase the effectiveness of streptozocin administration. Streptozocin increases the level of glucose in the blood and urine of animals, as well as that of diuresis, which indicates the development of a pathology similar to actual type 2 diabetes mellitus. As part of the study, the dynamics of changes in glucose in the blood and urine, daily diuresis, and body weight of animals were analyzed.

Keywords: maloben, streptozocin, preclinical trials, metformin, empagliflozin, high-fat diet

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

Funding: the study was carried out using the equipment of the Shared Use Center “Analytical Center of the Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health Care of Russia” within the framework of agreement No. 075-15-2021-685 dated July 26, 2021, with the financial support of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation.

For citation: Anisimova N.A., Ezhova A.O. Studying the Hypoglycemic Activity of Combinations of Maloben with Synthetic Antidiabetic Drugs on a Streptozocin Model of Diabetes Mellitus. *Journal Biomed.* 2024;20(3E):151–155. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-151-155>

Submitted 15.04.2024

Revised 05.08.2024

Published 01.11.2024

Введение

4,4'-(пропандиамидо)добензоат натрия (малобен) является перспективным соединением с выявленным ранее положительным влиянием на углеводный и жировой обмен. В ходе исследования была проведена оценка эффективности исследуемой фармацевтической субстанции в комбинациях с метформином либо эмпаглифлозином на грызунах на стрептозоциновой модели сахарного диабета (СД) в сочетании с высокожировой диетой (ВЖД). Именно комбинация ВЖД с дополнительным введением стрептозоточина (СТЗ) способна наиболее близко воспроизвести основные особенности метаболизма людей, страдающих ожирением и СД 2-го типа [1].

Материалы и методы

Исследования проводились на 30 самцах аутбредных крыс массой 200–320 г, полученных из питомника лабораторных животных «Рапполово» (Ленинградская обл.). Животные были поделены на три равные группы. В помещении для содержания

животных поддерживалась температура 20–23°C и относительная влажность воздуха 30–70%. Животные были размещены по 5 особей в систему содержания Bioscare производства «EHRET» (Германия) в условиях 12/12-часового свето-темнового режима. Условия для содержания животных соответствовали нормам, установленным ГОСТ Р 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики». Исследования были одобрены биоэтической комиссией ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России. Все манипуляции с животными проводились в соответствии с принципами Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и других научных целей (Страсбург, 1986), Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза от 22.09.2010 г. по охране животных, используемых в научных целях. ВЖД длилась 16 недель: животные получали корм, содержащий 73% стандартного корма, 25% рафинированного пищевого кокосового масла и 2% холе-

стерина, а также питьевую воду *ad libitum*. До и после диеты у всех животных измерялись масса тела (г), а также показатели уровня глюкозы в крови и моче (ммоль/л), объём суточного диуреза (мл). Введение свежеприготовленного р-ра СТЗ осуществлялось внутривенно в дозе 35 мг/кг. Для снижения смертности в течение 48 ч животные получали вместо питьевой воды 5%-ный р-р глюкозы. После введения СТЗ первой группе животных вводили комбинацию малобена (60 мг/кг) с метформином (150 мг/кг), второй группе — малобен (60 мг/кг) с эмпагlifозином (0,5 мг/кг). Исследуемые вещества вводили в половинных дозах от терапевтических. Животные третьей группы являлись контрольными, им вводили равный объём воды очищенной. Введение комбинаций исследуемых веществ осуществлялось перорально ежедневно на протяжении месяца. Каждую неделю измеряли показатели глюкозы в крови, моче, объём суточного диуреза и массу тела животных.

Статистическую обработку данных проводили в электронном виде при помощи программного обеспечения Microsoft

Excel 2016 («Microsoft Corp.», США). Достоверность различий опытных групп по отношению к контролю оценивали методом однофакторного и двухфакторного дисперсионного анализа по критерию p . Достоверными считались результаты при $p < 0,05$.

Результаты исследований

Через 24 ч с момента введения СТЗ отмечалось выраженное увеличение уровня глюкозы в крови во всех трёх группах: в группе с метформином уровень глюкозы увеличился на 256,1%, в группе с эмпагlifозином — на 278,4%, а в контрольной группе — на 278,0% относительно исходного. Через 72 ч после введения СТЗ и далее на протяжении всего эксперимента концентрация глюкозы в крови стала постепенно снижаться. На протяжении первых двух недель лечения более выраженный гипогликемизирующий эффект оказывала комбинация малобена с метформином: уровень глюкозы при этом был выше на 29,3% ($p < 0,05$) относительно исходного через 1 неделю и на 17,1% — через 2 недели ($p < 0,05$) (в контроле — на 82,9 и 70,7%

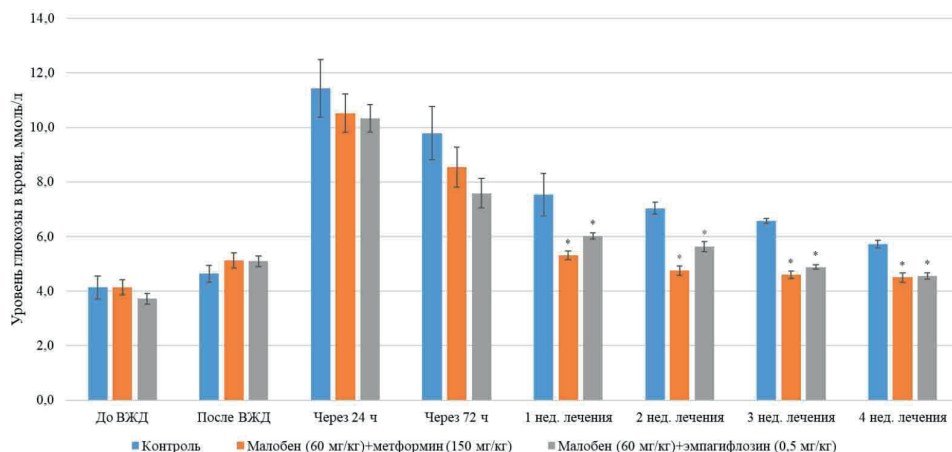


Рис. 1. Изменение уровня глюкозы в крови экспериментальных животных на фоне высокожировой диеты и стрептозоциновой модели диабета. * — различия достоверны ($p < 0,05$).

Fig. 1. Changes in blood glucose levels in experimental animals against the background of a high-fat diet and streptozocin model of diabetes. * — differences are significant ($p < 0.05$).

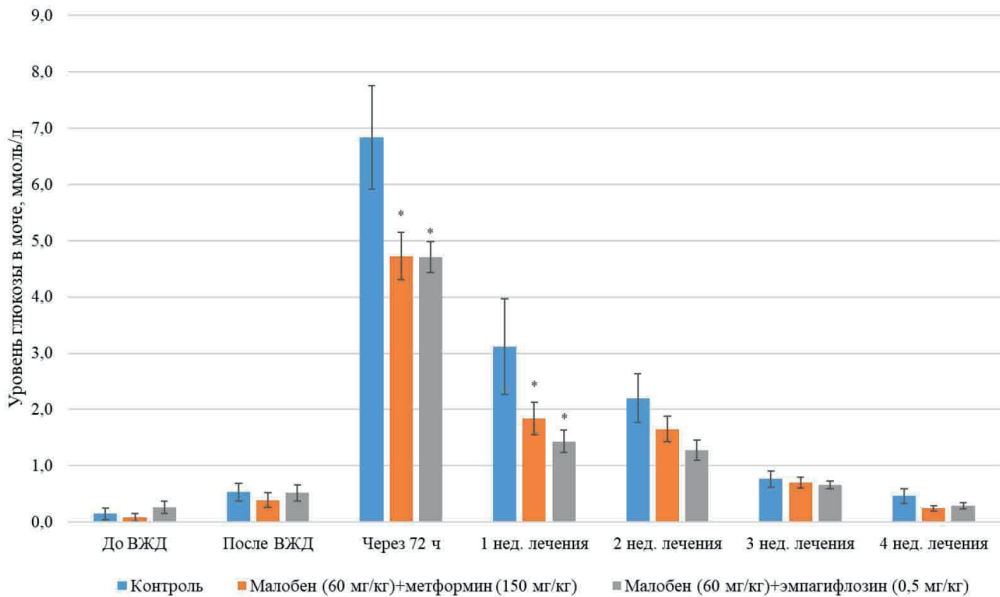


Рис. 2. Изменение уровня глюкозы в моче экспериментальных животных на фоне высокожировой диеты и стрептозоциновой модели диабета. * — различия достоверны ($p<0,05$).

Fig. 2. Changes in urine glucose levels in experimental animals against the background of a high-fat diet and streptozocin model of diabetes. * – differences are significant ($p<0.05$).

соответственно). В течение следующих двух недель обе комбинации давали очень близкий эффект, и к окончанию эксперимента в группе с метформином концентрация глюкозы в крови была выше исходной на 9,8% ($p<0,05$), а в группе с эмпаглифлозином — на 14,3% ($p<0,05$); в контрольной группе этот показатель был на 39,0% выше исходного (рис. 1).

При исследовании динамики глюкозы в моче достоверными оказались результаты через 72 ч после введения СТЗ и через 1 неделю введения комбинаций (рис. 2). В первом случае уровень глюкозы в моче был ниже, чем в контроле на 29,4% ($p<0,05$) в группе с метформином и на 24,3% ($p<0,05$) — в группе с эмпаглифлозином.

В процессе эксперимента наблюдалось выраженное влияние исследуемых веществ на объем суточного диуреза: через 72 ч после введения СТЗ объем диуреза увеличился на 202,6 и 138,1% от исходного в группах с метформином и эмпаглифлозином

соответственно (в контроле — на 254,3%), а через 1 мес. — на 31,6 и 30,9% в этих же группах соответственно (в контроле — на 71,7%).

Изменений в массе тела животных в течение эксперимента не наблюдалось.

Выводы

Проведённое исследование показало, что в условиях стрептозоцинового диабета на фоне ВЖД комбинации малобена с метформином и малобена с эмпаглифлозином, используемые в дозах, равных половинным от терапевтических, оказывали выраженный лечебный эффект. Изучаемые комбинации достоверно снижали уровень глюкозы в крови, в моче и объем диуреза по сравнению с контрольной группой. Полученные результаты могут являться основанием для сравнения этих комбинаций с комбинированными лекарственными препаратами, применяемыми в медицинской практике.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Спасенкова О.М., Ли А.О., Кириллова Н.В., Нечаева Е.А. Влияние экспериментального вещества малобена на показатели углеводного обмена при экспериментальном сахарном диабете. *Современные достижения химико-биологических наук в профилактической и клинической медицине: сб. науч. трудов 3-й Межд. конф., посвящённой 110-летию доктора биологических наук, профессора А.П. Бресткина*. СПб.: Изд-во ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России, 2022. [Spasenkova O.M., Li A.O., Kirillova N.V., Nechaeva E.A. Vliyanie eksperimental'nogo veshchestva malobena na pokazateli uglevodnogo obmena pri eksperimental'nom sakharnom diabete [Influence of the experimental substance maloben on the indicators of carbohydrate metabolism in experimental diabetes mellitus]. *Sovremennye dostizheniya khimiko-biologicheskikh nauk v profilakticheskoy i klinicheskoy meditsine: sb. nauch. trudov 3-y Mezh. konf., posvyashchennoy 110-letiyu doktora biologicheskikh nauk, professora A.P. Brestkina* [Modern Achievements of Chemical and Biological Sciences in Preventive and Clinical Medicine: Collection of Scientific Papers of the 3rd International Conference, dedicated to the 110th anniversary of Doctor of Biological Sciences, Professor A.P. Brestkin]. Saint Petersburg: FGBOU VO SZGMU im. I.I. Mechnikova Minzdrava Rossii Publ., 2022. (In Russian)].

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Анисимова Наталья Аскольдовна, к.б.н., доц., ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России;
e-mail: natalia.anisimova@pharminnotech.com

Natalya A. Anisimova, Cand. Sci. (Biol.), Assoc. Prof., Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: natalia.anisimova@pharminnotech.com

Ежова Александра Олеговна*, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России;
e-mail: alexandra.ejova@spcpcu.ru

Alexandra O. Ezhova*, Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: alexandra.ejova@spcpcu.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

ФОРМИРОВАНИЕ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ НЕЙРОПАТИИ У МЫШЕЙ C57BL/6 НА ФОНЕ ВЫСОКОЖИРОВОЙ ДИЕТЫ

Н.А. Бороздина^{1,2,*}, И.Н. Гладких³

¹ Филиал ФГБУН ГНЦ РФ Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН
142290, Российская Федерация, Московская обл., Пушкино, просп. Науки, 6

² Пушкинский филиал ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет»
142290, Российская Федерация, Московская обл., Пушкино, просп. Науки, 3

³ ФГБУН Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН
69004, Российская Федерация, Приморский край, Владивосток, просп. 100 лет Владивостоку, 159

Диабетическая нейропатия при сахарном диабете 2-го типа является одним из самых распространённых микрососудистых осложнений. Неконтролируемая гипергликемия приводит к формированию сосудистых аномалий, что в свою очередь вызывает ишемию нервных волокон. В нашем эксперименте мыши C57BL/6 содержались на высокожировой диете в течение 21 недели. На 17-й, 19-й и 21-й неделе у животных проводилось измерение концентрации глюкозы в крови и функциональное тестирование с использованием филламентов фон Фрея, горячей пластины и охлаждения конечностей ацетоном. В проведённом исследовании у мышей C57BL/6 на высокожировой диете наблюдалась повышенная чувствительность к механическому воздействию, охлаждению и нагреванию конечностей, что может свидетельствовать о развитии диабетической полинейропатии.

Ключевые слова: сахарный диабет 2-го типа, мыши C57BL/6, диабетическая нейропатия, высокожировая диета

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: работа поддержана грантом Российского научного фонда № 21-74-20147.

Для цитирования: Бороздина Н.А., Гладких И.Н. Формирование диабетической нейропатии у мышей C57BL/6 на фоне высокожировой диеты. *Биомедицина*. 2024;20(3E):156–159. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-156-159>

Поступила 15.04.2024

Принята после доработки 22.07.2024

Опубликована 01.11.2024

DEVELOPMENT OF DIABETIC NEUROPATHY IN C57BL/6 MICE IN THE SETTING OF A HIGH-FAT DIET

Natalya A. Borozdina^{1,2,*}, Irina N. Gladkikh³

¹ Branch of the Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry
of the Russian Academy of Sciences
142290, Russian Federation, Moscow Region, Pushchino, Nauki Ave., 6

² Pushchino Branch of the Russian Biotechnological University
142290, Russian Federation, Moscow Region, Pushchino, Nauki Ave., 3

³ G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch
of the Russian Academy of Sciences
690041, Russian Federation, Primorsky Krai, Vladivostok, 100 Let Vladivostoku Ave., 159

Diabetic neuropathy in type 2 diabetes mellitus is one of the most common microvascular complications. Uncontrolled hyperglycemia leads to the formation of vascular abnormalities, eventually causing ischemia of nerve fibers. In our experiment, C57BL/6 mice were maintained on a high-fat diet for 21 weeks. At week 17, 19, and 21, blood glucose concentrations were measured; functional testing was performed using von Frey filaments, hot plate and limb cooling with acetone. In the present study, C57BL/6 mice on a high-fat diet showed increased sensitivity to mechanical stimulus, limb cooling and heating, which may indicate the development of diabetic polyneuropathy.

Keywords: type 2 diabetes mellitus, C57BL/6 mice, diabetic neuropathy, high-fat diet

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

Funding: this work was supported by the Russian Science Foundation, grant No. 21-74-20147.

For citation: Borozdina N.A., Gladikh I.N. Development of Diabetic Neuropathy in C57BL/6 Mice in the Setting of a High-Fat Diet. *Journal Biomed.* 2024;20(3E):156–159. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-156-159>

Submitted 15.04.2024

Revised 22.07.2024

Published 01.11.2024

Введение

Сахарный диабет 2-го типа (СД2) характеризуется повышенным уровнем глюкозы в крови из-за дефицита концентрации и/или чувствительности к инсулину [1]. Неконтролируемая гипергликемия, возникающая при усилении инсулинорезистентности, провоцирует развитие микрососудистых и макрососудистых осложнений. Сосудистые аномалии, развивающиеся вследствие гипергликемии, способствуют ишемии нейронов. Нейропатия может включать широкий спектр клинических синдромов, включая паралич черепных нервов, монойнепатии и вегетативную дисфункцию [4]. Модели на мышах линии C57BL/6 демонстрируют развитие термической аллодинии, однако не все животные модели соответствуют этиологическим критериям формирования СД2 [3].

Целью работы являлось исследовать развитие различных видов сенсорных нарушений на модели сахарного диабета 2-го типа у мышей линии C57BL/6.

Материалы и методы

48 самцов мышей линии C57BL/6 в возрасте 4 недель массой 17–20 г со стату-

сом SPF были получены из НПП ФИБХ РАН питомника лабораторных животных «Пушино» (Московская обл.) и находились в комнате содержания животных барьерного типа лаборатории биологических испытаний ФИБХ РАН. В комнате содержания животных барьерного типа поддерживалась автоматическая 12-часовая смена дневного и ночного периода и как минимум 12-кратная смена воздушного объема комнаты в час. Температура и влажность находились под контролем системы мониторинга EVL. Вода Milli-RO (Millipore) давалась *ad libitum*. Экспериментальный протокол был одобрен Институциональной комиссией по контролю и использованию лабораторных животных ФИБХ РАН.

Моделирование СД2 проводилось путём содержания животных на высокожировой диете (ВЖД) в течение 21 недели, контрольная группа в это время получала стандартный гранулированный корм для содержания лабораторных грызунов SNIFF R1/M-H V1534-30 (автоклавируемый). Диеты давались *ad libitum*. ВЖД готовилась на основе стандартного гранулированного корма путём добавления к 700 г перемолотого корма 300 г свиного растопленного жира, воды (350 мл), пищевой соли (10 г) и глута-

мата натрия (28,5 г) [2]. На 17-й, 19-й и 21-й неделе исследования проводилось измерение концентрации глюкозы в капиллярной крови с помощью глюкометра Сателлит-экспресс (ЭЛТА) натошак, а также функциональные тесты для оценки изменения чувствительности животных к механическим стимулам, нагреванию и охлаждению. Чувствительность к охлаждению оценивалась в ацетоновом тесте, где животным наносили 50 мкл ацетона на правую заднюю конечность и оценивали продолжительность реакций. Чувствительность к механическим стимулам оценивалась прибором BIO-EVF («Bioseb», США) по методу фон Фрея путём постепенного надавливания филаментами на подушечку задних лап. Чувствительность животных к нагреванию оценивалась с помощью прибора «Hot-Plate

analgesia meter» («Columbus Instruments», США). Животное помещали в камеру на нагретую площадку прибора ($50 \pm 0,1^\circ\text{C}$, $25,3 \times 25,3$ см) и регистрировали латентное время подпрыгивания. После проведения функциональных тестов животные подвергались эвтаназии в CO_2 -камере.

Выборки были проанализированы на нормальность в тесте Колмогорова — Смирнова. Для установления межгрупповых различий количественные данные были проанализированы в попарном сравнении с помощью теста Манна — Уитни для распределений, отличных от нормального, или с помощью t-критерия Стьюдента для групп с нормальным распределением. Статистический анализ проводили с использованием программы Prism 5.0 («GraphPad», США).

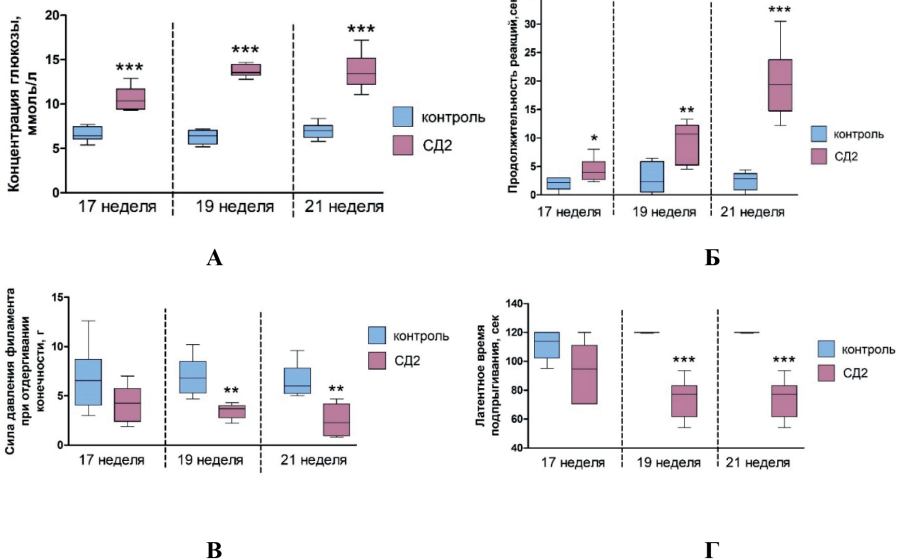


Рис. Физиологические и биохимические изменения у мышей C57BL/6 на 17-й, 19-й и 21-й неделе исследования: А — концентрация глюкозы в крови натошак; Б — продолжительность реакций после нанесения ацетона в тестировании чувствительности к охлаждению; В — чувствительность к механическому стимулу в тесте фон Фрея; Г — чувствительность к нагреванию в приборе Hot-Plate. * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$, *** — $p < 0,001$ в сравнении с контрольной группой.

Fig. Physiological and biochemical changes in C57BL/6 mice at week 17, 19, and 21 of the study: A — fasting blood glucose concentration; Б — duration of responses after acetone application in a cooling sensitivity test; В — sensitivity to mechanical stimulus in a von Frey test; Г — sensitivity to heating in a hot-plate test. * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$, *** — $p < 0,001$ compared to the control group.

Результаты исследований

У животных на ВЖД наблюдалась выраженная гипергликемия на 17-й неделе исследования, которая составляла в среднем 11 ммоль/л (рис., А). На 19-й и 21-й неделе исследования гипергликемия составляла в среднем 14 ммоль/л. На фоне гипергликемии у животных обнаружено повышение чувствительности к охлаждению, нагреванию и механическим стимулам (рис., А–Г). При нанесении ацетона на заднюю лапу у животных на ВЖД отмечалось значительное увеличение продолжительности реакций (рис., Б). Мыши, содержащиеся на ВЖД в течение 19-й и 21-й недели, демонстрировали более выраженную реакцию на механическую стимуляцию филamentsами фон Фрея по сравнению

с контрольной группой (рис., В). Латентное время подпрыгивания на горячей пластине было значительно снижено у мышей на ВЖД через 19-ю и 21-ю неделю по сравнению с контрольной группой (рис., Г).

Вывод

Содержание мышей линии C57BL/6 на высокожировой диете в течение 19 и 21 недели привело к значительному увеличению чувствительности конечностей к механическим стимулам, нагреванию и охлаждению. Такие изменения в функциональных тестах свидетельствуют о развитии диабетической нейропатии, которая возникает вследствие длительного гипергликемического состояния у животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Artasensi A., Pedretti A., Vistoli G., Fumagalli L. Type 2 diabetes mellitus: A review of multi-target drugs. *Molecules*. 2020;25(8):1987. DOI: 10.3390/molecules25081987
2. Borozdina N.A., Shaikhutdinova E.R., Slasheva G.A., Goryacheva N.A., Zamyatina A.V., Sadovnikova E.S., Pakhomova I.A., Pavlov V.M., Perepechenova N.A., Severyukhina M.S., Fedotova A. Yu., Popkova D.V., Gladkikh I.N., Leichenko E.V., Dyachenko I.A. Characterization of risk factors for modeling of type 2 diabetes mellitus induced by a high-fat diet in C57BL/6 mice. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2024;176(4):461–465. DOI: 10.1007/s10517-024-06047-6
3. O'Brien P.D., Sakowski S.A., Feldman E.L. Mouse models of diabetic neuropathy. *ILAR J.* 2014;54(3):259–272. DOI: 10.1093/ilar/ilt052
4. Vithian K., Hurel S. Microvascular complications: pathophysiology and management. *Clin. Med. (Lond.)*. 2010;10(5):505–509. DOI: 10.7861/clinmedicine.10-5-505

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Бороздина Наталья Андреевна*, Филиал ФГБУН ГНЦ РФ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушкинский филиал ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет»;
e-mail: borozdina@bibch.ru

Гладких Ирина Николаевна, к.х.н., ФГБУН Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН;
e-mail: irinagladkikh@gmail.com

Natalya A. Borozdina*, Branch of the Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Pushchino Branch of the Russian Biotechnological University;
e-mail: borozdina@bibch.ru

Irina N. Gladkikh, Cand. Sci. (Chem.), G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: irinagladkikh@gmail.com

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОРАСПРЕДЕЛЕНИЯ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОГО ПРОДУКТА НА ОСНОВЕ ХОНДРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ПРИ ИМПЛАНТАЦИИ МЫШАМ ЛИНИИ BALB/C NUDE

П.А. Голубинская^{1,*}, А.С. Пикина¹, Е.С. Ручко¹, Е.В. Коженевская², А.Д. Поспелов²,
А.А. Бабаев², В.А. Иванов¹, Ю.А. Беспярых¹, Л.С. Шнайдер³, А.В. Еремеев¹

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

² ФГАОУ ВО «Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»
603022, Российская Федерация, Нижний Новгород, просп. Гагарина, 23

³ ГБУЗ «Московский клинический научный центр им. А.С. Логинова» ДЗМ
111123, Российская Федерация, Москва, ул. Новогиреевская, 1, корп. 1

Целью данной работы было исследовать биораспределение разработанного нами продукта тканевой инженерии (ПТИ) на основе хондроцитов различного генеза в виде 3D-структур (хондросфер) после подкожной имплантации иммунодефицитным мышам линии Balb/c Nude. В начале имплантировали хондросферы на основе хондроцитов человека, хондроцитов из дифференцированных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), в т. ч. линии с нокаутом гена $\beta 2m$. В течение 9 мес. проводили наблюдение за животными. Далее от мышей после эвтаназии получали образцы органов и тканей для гистологического анализа, оценки состоятельности имплантата, его интеграции и исследования биораспределения методом ПЦР. Хондросферы из дифференцированных производных ИПСК успешно интегрировались в окружающие ткани в зоны инокуляции, формировали хрящевую ткань. В образцах около имплантационной зоны опытных групп животных не было выявлено человеческой ДНК, которую обнаруживали в образцах органов контрольных групп (введение MDA231 и мезенхимальных стволовых клеток). Таким образом, исследуемые образцы ПТИ через 3 и 9 мес. после имплантации демонстрировали отсутствие биораспределения в другие ткани и органы мышей, что свидетельствует в пользу безопасности разрабатываемого препарата.

Ключевые слова: препарат тканевой инженерии, хондроциты, биораспределение, доклинические исследования, хондросферы, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: научное исследование проведено в рамках гранта РНФ № 22-15-00250.

Благодарности: авторы выражают свою признательность научным сотрудникам лаборатории клеточной биологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России за методологическую поддержку в процессе исследования.

Для цитирования: Голубинская П.А., Пикина А.С., Ручко Е.С., Коженевская Е.В., Поспелов А.Д., Бабаев А.А., Иванов В.А., Беспярых Ю.А., Шнайдер Л.С., Еремеев А.В. Исследование биораспределения тканеинженерного продукта на основе хондроцитов человека различного происхождения при имплантации мышам линии Balb/c Nude. *Биомедицина*. 2024;20(3E):160–175. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-160-175>

Поступила 23.08.2024

Принята после доработки 30.09.2024

Опубликована 01.11.2024

STUDY OF THE BIODISTRIBUTION OF A TISSUE-ENGINEERED PRODUCT BASED ON HUMAN CHONDROCYTES OF VARIOUS SOURCES AFTER IMPLANTATION INTO BALB/C NUDE MICE

Polina A. Golubinskaya^{1*}, Arina S. Pikina¹, Eugene S. Ruchko¹,
Evgeniya V. Kozhenevskaya², Anton Dz. Pospelov², Aleksey A. Babaev², Viktor A. Ivanov¹,
Julia A. Bespyatykh¹, Lev S. Shnyder³, Artem V. Ereemeev¹

¹ Federal Scientific and Clinical Center of Physical and Chemical Medicine
named after Yu.M. Lopukhin of the Federal Medical and Biological Agency of Russia
119435, Russian Federation, Moscow, Malaya Pirogovskaya Str., 1a

² Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod
603022, Russian Federation, Nizhny Novgorod, Gagarina Ave., 23

³ Moscow Clinical Scientific Center named after A.S. Loginov of the Moscow Health Care Department
111123, Russian Federation, Moscow, Novogireyevskaya Str., 1, Building 1

In this research, we develop a tissue-engineered product (TEP) based on chondrocytes of various genesis in the form of 3D structures (chondrospheres) after subcutaneous implantation in immunodeficient Balb/c Nude mice and investigate its biodistribution profile. Initially, chondrospheres based on chondrocytes and chondrocytes from differentiated induced pluripotent stem cells (iPSCs), including lines with a knockout of the $\beta 2m$ gene, were implanted. The animals were monitored for nine months. Further, after euthanasia, organ and tissue samples were obtained for histological analysis, evaluation of the viability of the implant, its integration and biodistribution research by PCR. Chondrospheres from differentiated iPSCs derivatives of both types successfully integrated into the surrounding tissues in the inoculation zones and formed cartilage tissue. In the samples near the implantation zone of the experimental groups of animals, no human DNA was detected. Human DNA was found in the samples of organs of the control groups (introduction of MDA231 and mesenchymal stem cells). Thus, three and nine months after implantation, the studied TEP samples demonstrated the absence of biodistribution to other tissues and organs of mice, which indicates the safety of the drug being developed.

Keywords: tissue engineering, chondrocytes, biodistribution, preclinical studies, chondrospheres, induced pluripotent stem cells

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

Funding: this work was financially supported by Russian Science Foundation (Grant No. 22-15-00250).

Acknowledgements: the authors express their gratitude to the scientific staff of the Laboratory of Cell Biology of the Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of the Federal Medical and Biological Agency of Russia for methodological support in the research process.

For citation: Golubinskaya P.A., Pikina A.S., Ruchko E.S., Kozhenevskaya E.V., Pospelov A.Dz., Babaev A.A., Ivanov V.A., Bespyatykh Ju.A., Shnyder Le.S., Ereemeev A.V. Study of the Biodistribution of a Tissue-Engineered Product Based on Human Chondrocytes of Various Sources After Implantation into Balb/c Nude Mice. *Journal Biomed.* 2024;20(3E):160–175. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-160-175>

Submitted 23.08.2024

Revised 30.09.2024

Published 01.11.2024

Введение

Воспалительные заболевания суставов, особенно после травм у лиц, связанных с экстремальной деятельностью, широко распространены во всём мире и характе-

ризуются последующими хроническими дегенеративными изменениями хрящевой ткани. Отсутствие сосудистой сети в суставе, низкая пролиферативная активность зрелых хондроцитов и большое ко-

личество внеклеточного матрикса (ВКМ) в сочетании с воспалительным процессом в ткани препятствуют естественной регенерации суставного хряща; в результате заболевание прогрессирует до полной дегенерации суставного аппарата, затрагивая поверхностные слои костной и хрящевой ткани [12], что приводит к инвалидизации. Использование продуктов тканевой инженерии (ПТИ) считается оправданным у пациентов на I–II стадиях патологического процесса [15]. При более глубоких деформациях необходимо выполнение корригирующей остеотомии, а в тяжёлых случаях показано эндопротезирование [20].

Аутологичные хондроциты являются клиническим подходом, который доказал свою эффективность. Одним из используемых за рубежом клеточных препаратов для терапии дефектов суставного хряща человека является Spherox™ («Co.don», Германия), который представляет собой тканеинженерную 3D-конструкцию из аутологичных клеток пациента. На данный момент компания ОА «Генериум» по лицензии «Co. don» производит данный препарат в РФ [1]. Учитывая положительные результаты исследований в области клеточной терапии, развитие и внедрение подобных технологий в исследовательскую и медицинскую практику в РФ является востребованным.

Несмотря на то, что продукты клеточных технологий на основе аутологичных хондроцитов для восстановления хряща уже присутствуют на медицинском рынке, они направлены преимущественно на коррекцию незначительных повреждений суставного хряща и не покрывают потребности пациентов с тяжёлыми или обширными поражениями [7]. В частности, при появлении остеофитов применение клеточных технологий может быть ограничено, а в случае длительного применения глюкокортикоидов, лучевой и химиотерапии, когда утрачивается хондрогенный потенциал хрящевой ткани, — невозможно получить

достаточное количество аутологичных хондроцитов для создания полноценного хрящевого имплантата, для которого требуется большое количество дифференцированных клеток [13]. Возраст донора также влияет на потенциал дифференцировки, иммуномодулирующие свойства и миграционные способности клеток, что ограничивает их использование для некоторых пациентов. Применение хондроцитов также ограничено нестабильностью фенотипа и спонтанной дедифференцировкой, происходящей во время культивирования [18]. В связи с этим индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) являются перспективным источником хондрогенно-дифференцированных клеток [9]. В отличие от аутологичных хондроцитов и мезенхимальных стволовых клеток (МСК), ИПСК демонстрируют неограниченный рост *in vitro* и широкий спектр возможностей к дифференцировке, аналогичный эмбриональным стволовым клеткам (ЭСК), но без этических проблем [23]. На сегодняшний день есть сообщения об успешных трансплантациях аутологичных клеток, дифференцированных из ИПСК [16]. Однако получение ИПСК с последующей дифференцировкой и созданием трансплантата — это весьма длительный и дорогостоящий процесс, который нуждается в оптимизации и стандартизации. В литературе есть данные об успешном приживлении в суставном хряще обезьян ИПСК, дифференцированных в хондрогенном направлении. В данном исследовании размеры дефекта хрящевой ткани были небольшими, поэтому необходимы дальнейшие исследования на других моделях. Что касается исследования иммуногенности, трансплантат при подсадке в хрящевые дефекты через четыре недели не вызывал иммунной реакции у макаков, в то время как в костно-хрящевых дефектах трансплантат, хотя и оставался интактным, был окружён большим скоплением

Т-лимфоцитов [3]. Перспективным подходом представляется создание и применение хрящевых трансплантатов на основе аллогенных дифференцированных в хондроциты ИПСК с пониженной иммуногенностью, универсальных для всех реципиентов [1]. Тем не менее, для хондроцитарных производных человека такие данные еще предстоит получить в будущем.

Большей перспективностью для терапии дефектов суставного хряща обладают трёхмерные структуры в виде сфероидов, образованные в результате самоагрегации клеток в специальных 3D-условиях культивирования [21]. Использование такой технологии благоприятно сказывается на пролиферативной активности и фенотипической стабильности зрелых хондроцитов [11]. В отличие от суспензии аутологичных хондроцитов, которые становятся способными к выработке внеклеточного матрикса (ВКМ) только через определённое время после имплантации, клетки в составе сфероидов способны к секреции компонентов ВКМ уже в условиях *in vitro* [22]. Кроме того, сфероиды не требуют использования ксеногенных или искусственных материалов и легко интегрируются в окружающие ткани в зоне имплантации [21]. В совокупности перечисленные свойства сфероидных ПТИ способствуют качественному заполнению дефекта хрящевой ткани. Ранее эффективность подобного подхода была продемонстрирована на животных моделях с использованием сфероидов, полученных из первичных культур хондроцитов человека, в клинических исследованиях [10], что доказывает значительно больший терапевтический эффект с точки зрения структурного восстановления дефекта хряща по сравнению с классической хирургической процедурой микроповреждений [22].

Целью настоящего исследования было изучение биораспределения сфероидного ПТИ «Хондросферы», разработанно-

го нами для последующей терапии повреждений суставного хряща у человека, через 9 мес. после подкожной имплантации иммунодефицитным мышам линии Balb/c Nude.

Материалы и методы

Нормативное регулирование

Данная работа представляла собой исследование нового ПТИ и проводилась согласно требованиям действующих нормативных регуляторов [19]. Исследование осуществляли согласно заранее утверждённому плану и в соответствии со стандартными операционными процедурами. Весь персонал вивария, проводивший работы по данному проекту, был обучен гуманному обращению с лабораторными животными в соответствии с Директивой Европейского парламента и Совета Европейского Союза 2010/63/ЕС от 22.09.2010 г. «О защите животных, использующихся для научных целей».

Лабораторные животные

Исследование проводилось в виварии Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского и было одобрено Комиссией по биоэтике. В проведённом исследовании безопасности была выбрана инбредная линия мышей Balb/c Nude с иммунодефицитом. Животные были получены из питомника Charles River Laboratories («CRL», США) в 2017 г. На момент начала исследования возраст животных составлял 2 мес., средняя масса — $18,8 \pm 2,17$ г. Мышей содержали в IVC клетках GM500 Tecniplast, подключённых к системе ICV Smartflow Tecniplast, по 1–4 мыши на клетку с учётом пола животных. Смена клеток осуществлялась в ламинарном шкафу CS5 EVO. Комбикорм для лабораторных крыс и мышей «Дельта Фидс» (АО «БиоПро», Россия) и подстил для разведения и содержания лабораторных животных (ИП Филонич А.А., Россия) подвергались автоклавированию перед использованием. Вода, очищенная с помощью системы очистки воды RiOs 50

(«Merk Millipore», США) (50 л/ч), подавалась в автоклавированных питьевых бутылочках. Доступ к воде и корму — *ad libitum*. В комнате содержания SPF-животных барьерного типа поддерживались следующие условия окружающей среды: температура воздуха — $22 \pm 2^\circ\text{C}$; относительная влажность — $50 \pm 20\%$; автоматическая смена 12-часового светового периода (08.00–20.00 — день, 20.00–08.00 — ночь); 100%-ное вентилирование без рециркуляции с 10-кратной сменой объема воздуха в час.

Исследуемый препарат

и контрольные линии клеток

Исследуемые ПТИ представляли собой 3D-культуру сфероидов на основе хондроцитов человека или ИПСК, дифференцированных в хондрогенном направлении, и были получены, как описано ранее [2, 8]. Клетки линии RG4SΔb2m c155 представляли собой линию без генетических модификаций (ИПСК P1), вторая линия ИПСК RG4SΔb2m c155/1 являлась нокаутной по гену $\beta 2m$ (ИПСК P2). Получение, культивирование и исследование данной линии клеток описано в работах [5, 6]. Культивирование ИПСК проводилось на пластике, предварительно обработанном р-ром Matrigel («Corning», США), на смеси питательных сред «ГибриС-8» («ПанЭко», Россия) и mTeSR™ («STEMCELL Technologies», Канада) в соотношении 4:1. Обе линии ИПСК были дифференцированы в хондроциты с помощью протокола, который представляет собой комбинацию подходов, описанных в работах [14, 24]. В качестве питательной среды для хондроцитов использовали Advanced DMEM (Gibco, «Thermo Fisher Scientific», США) с добавлением 10% FBS («PAN Biotech», Германия), 100x GlutaMAX (Gibco, «Thermo Fisher Scientific», США), 50x B27 (Gibco, «Thermo Fisher Scientific», США), 1% инсулин-трансферрин-селенита (ИТС) («ПанЭко», Россия), 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты («Sigma

Aldrich», США), 50 мкМ β -меркаптоэтанола, 50 мкг/мл 100x-р-ра пенициллина/стрептомицина («ПанЭко», Россия). Культивирование сфероидов проводили в течение 28 сут, смену среды осуществляли каждые 3–4 сут. Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) были получены путём ферментативной обработки жировой ткани от здоровых доноров. Линия клеток рака молочной железы MDA 231 была получена из биобанка лаборатории клеточной биологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России и не подвергалась никаким дополнительным манипуляциям кроме культивирования *in vitro* для наращивания необходимого количества материала. Клетки линии MDA 231 и линию МСК культивировали в среде Advanced DMEM (Gibco, «Thermo Fisher Scientific», США) с добавлением 10% FBS («PAN Biotech», Германия) и 50 мкг/мл 100x-р-ра пенициллина/стрептомицина («ПанЭко», Россия) в стандартных условиях при 37°C и 5% CO_2 .

Дизайн эксперимента

ПТИ на основе хондроцитов человека вводили животным ($n=24$; 12 самок + 12 самцов) подкожно однократно в область головы между ушей в одной дозе в виде пяти сфероидов в физ. р-ре (группа 1). ПТИ из ИПСК, дифференцированных в хондрогенном направлении, имплантировали животным в той же дозе подкожно (группы 3–4, $n=16$, самцы). В группе плацебо-контроля было 24 мыши (12 самцов + 12 самок), которым подкожно в голову вводили 50 мкл физ. р-ра (группа 2). Мышам в группах положительного контроля подкожно закалывали линию МСК в дозе 250 тыс. клеток в 50 мкл Matrigel® («Corning», США) (группа 5, $n=2$, самцы) или линию клеток рака молочной железы MDA 231 в количестве 500 тыс. клеток в 50 мкл в 50 мкл Matrigel® (группа 6, $n=4$, самцы).

В течение всего эксперимента регулярно проводили взвешивание животных, наблюдение за их поведением, измеряли размер

инокулята в зоне имплантации электронным штангенциркулем и производили фотофиксацию внешнего вида подопытных животных. Через 3 мес. после начала эксперимента 50% самцов и самок групп 1 и 2, 50% самцов групп 3 и 4, а также все животные групп 5 и 6 были подвергнуты эвтаназии. После этого из животных были извлечены образцы следующих органов и тканей: лимфатические узлы, щитовидная железа, аорта, сердце, лёгкие, тимус, пищевод, желудок, поджелудочная железа, тонкий кишечник, толстый кишечник, печень, селезёнка, почки, мочевой пузырь, надпочечники, головной мозг, семенники, яичники, место введения, кровь. Умерщвлённых животных обрабатывали 96%-ным этанолом, последующие этапы изъятия образцов органов и тканей проводили в асептических условиях ламинарного бокса II класса защиты. Анализ биораспределения через 3 мес. после введения ПТИ показал отсутствие миграции в отдалённые органы и ткани, при этом человеческая ДНК детектировалась только в месте введения. Аналогичные манипуляции были проведены с оставшимися животными через 9 мес. после введения.

Гистологический анализ

Препараты готовили, как описано ранее [2]. Срезы окрашивали гематоксилином-

эозином и альциановым синим («Био Витрум», Россия).

Выделение нуклеиновых кислот и постановка ПЦР

Выделение геномной ДНК из органов мышей и капиллярной крови здорового донора, которую использовали в качестве положительного контроля человеческой ДНК, проводили, как описано ранее [2].

РНК выделяли с помощью регента ExtractRNA («Евроген», Россия). Обратную транскрипцию ставили с помощью набора MMLV RT («Евроген», Россия). ПЦР проводили с использованием готовой смеси для ПЦР 5X Screen Mix («Евроген», Россия) согласно инструкции производителя. В реакции для доказательства экспрессии хондроцитарных генов в культуре ИПСК-производных использовали праймеры, специфичные к генам *ACAN*, *ColIA2*, *ColIII1*, *SOX9*. В качестве референсного гена применялся ген домашнего хозяйства *YWHAZ* (табл. 1).

Реакцию проводили при использовании термоциклера для амплификации нуклеиновых кислот 1000 CFX Manager («BioRad», США) и программного обеспечения CFX Manager. Количество циклов — 39. Анализ результатов проводили в программе Microsoft Excel по методу $\Delta\Delta Ct$.

В реакции по оценке биораспределения использовали праймеры, специфичные

Таблица 1. Последовательности праймеров, используемых для оценки хондрогенной дифференцировки
Table 1. Sequences of primers used to assess chondrogenic differentiation

Название праймера	Последовательность 5'→3'	Длина продукта, п.о.
ACAN-F	AGGAGTCCCTGACCTGGTTT	167
ACAN-R	CCTGACAGATCTGCCTCTCC	
ColIA2-F	AGGGTGAGACAGGCGAACA	184
ColIA2-R	CCGTTGAGTCCATCTTTGC	
ColIII1-F	TGGACGCCATGAAGTTTTCT	142
ColIII1-R	CCATTGATGGTTTCTCCAAACC	
SOX9-F	GAAGTCGGTGAAGAACGGGC	283
SOX9-R	CACGTCGCGGAAGTCGATAG	
YWHAZ-F	ACTTTTGGTACATTGTGGCTTCAA	94
YWHAZ-R	CCGCCAGGACAAACCAAGTAT	

Таблица 2. Последовательности праймеров, используемых для оценки биораспределения
Table 2. Sequences of primers used for biodistribution assessment

Название праймера	Последовательность 5'→3'	Длина продукта, п.о.
mActb-F	GAT GCA CAG TAG GTC TAA GTG GAG	121
mActb-R	CAC TCA GGG CAG GTG AAA CT	
COI-F	CAA CCT CAA CAC CAC CTT C	269

к генам цитохром-С-оксидазы 1 (*COI*) для обнаружения ДНК человека и β -актина, специфичного для мыши (*mActb*) для определения мышинной ДНК (табл. 2). Детекцию результатов ПЦР проводили с помощью электрофореза. Электрофорез ДНК проводили, как описано в работе [2].

Статистический анализ

Полученные результаты измерения массы испытуемых животных обрабатывали с помощью пакета программ SPSS Statistics 17.0 («IBM», США). Для проверки нормальности распределения признака применяли тест Шапиро — Уилка. В качестве метода сравнения использован *U*-тест Манна — Уитни (Mann — Whitney *U*-test). При множественных сравнениях применяли поправку Бонферрони. Различия между группами считали статистически досто-

верными при уровне значимости $p < 0,05$. Для построения графиков использовали программное обеспечение GraphPad Prism 9.5.1 («Dotmatics», США).

Результаты исследований

Контроль качества дифференцировки ИПСК

В качестве контроля проводимой дифференцировки ИПСК в хондрогенном направлении использовался метод ПЦР в реальном времени. Для используемых культур клеток подтвердили наличие экспрессии генов, характерных для хондроцитов человека (рис. 1).

Морфометрический анализ

При регулярном взвешивании животных в течение 9 мес. (рис. 2) статистически значимых различий по весу не выяв-

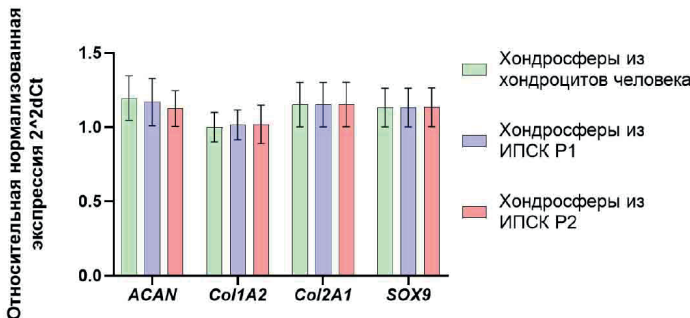


Рис. 1. Экспрессия хондрогенных маркеров клетками, используемыми для изготовления Хондросфер. Исследовалась экспрессия генов: *ACAN* — агрекан; *Col1A2* — коллаген 1-го типа; *Col2A1* — коллаген 2-го типа; *SOX9* — sex-determining region Y (*SRY*)-box 9. ИПСК P2 — Хондросферы на основе ИПСК с нокаутом $\beta 2m$, дифференцированных в хондрогенном направлении; ИПСК P1 — Хондросферы на основе ИПСК, дифференцированных в хондрогенном направлении.

Fig. 1. Expression of chondrogenic markers by cells used for the manufacture of Chondrospheres. Gene expression was studied: *ACAN* — aggrecan; *Col1A2* — type 1 collagen; *Col2A1* — type 2 collagen; *SOX9* — sex-determining region Y (*SRY*)-box 9. iPSC P2 — Chondrospheres based on iPSCs with $\beta 2m$ knockout, differentiated in the chondrogenic direction; iPSC P1 — Chondrospheres based on iPSCs, differentiated in the chondrogenic direction.

лено при сравнении контрольной группы с опытными.

Общеклиническое состояние животных опытных и контрольных групп не отличалось. Животные сохраняли активность и нормальное пищевое поведение. По результатам измерений размеров инокулята с течением времени были выявлены статистически значимые различия в размере новообразований между группой закола Хондросфер из хондроцитов человека и группой введения Хондросфер из ИПСК-производных (рис. 3).

Динамика изменений размера новообразований в положительных контрольных группах представлена на рис. 4.

Динамика размеров инокулята в опытной группе закола хондросфер из человеческих хондроцитов на поздних сроках исследования представлена на рис. 5.

Гистологический анализ

В результате гистологического исследования образцов ткани из зоны имплантации ПТИ наблюдали наличие стабильной хрящевой ткани с большим количеством хондроцитов и лакун, характерных для данного вида соединительной ткани (табл. 3). Миграция клеток из зоны имплантации была минимальной, без инвазивных черт. В группе положительного контроля после введения клеток линии аденокарциномы молочной железы MDA231 на гистологиче-

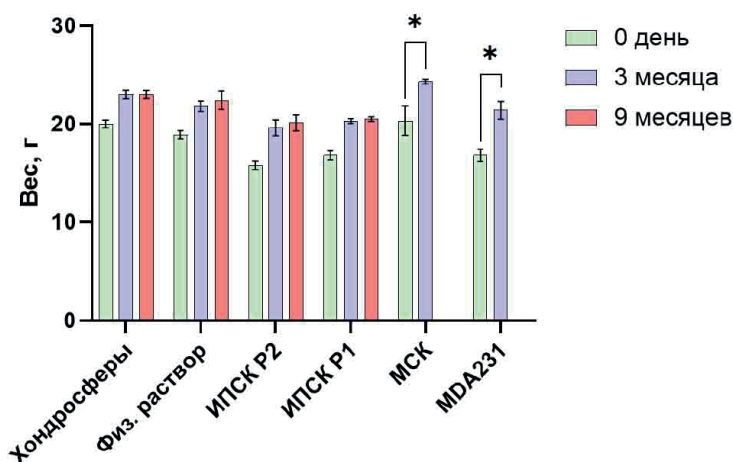


Рис. 2. Изменение массы тела экспериментальных животных по группам в ходе эксперимента на ранних этапах исследования (3 мес.) и на поздних сроках (9 мес.). По оси абсцисс обозначены сутки после введения, по оси ординат — вес, г. Хондросферы — группа самцов и самок, которым имплантировали ПТИ на основе хондроцитов человека, $n=24$; Физ. раствор — группа самцов и самок, которым подкожно вводили физ. р-р, $n=24$; ИПСК P2 — группа самцов, которым имплантировали ПТИ на основе ИПСК с нокаутом гена $\beta 2m$, дифференцированных в хондрогенном направлении, $n=8$; ИПСК P1 — группа самцов, которым имплантировали ПТИ на основе ИПСК, дифференцированных в хондрогенном направлении, $n=8$; МСК — группа самцов, которым имплантировали МСК, $n=2$; MDA231 — группа самцов, которым подкожно вводили линию клеток аденокарциномы молочной железы, $n=4$. * — статистически значимые различия, $p<0,05$.

Fig. 2. Changes in the body weight of experimental animals by groups during the experiment at the early stages of the study (3 months) and in the late stages of the study (9 months). The abscissa indicates the day after transplantation, the ordinate indicates weight, g. Хондросферы — a group of males and females implanted with TEP based on human chondrocytes, $n=24$; Физ. раствор — a group of males and females subcutaneously injected with saline solution, $n=24$; ИПСК P2 — a group of males who TEP based on iPSCs with $\beta 2m$ gene knockout was implanted, differentiated in the chondrogenic direction, $n=8$; ИПСК P1 — group of males implanted with TEP based on iPSCs differentiated in the chondrogenic direction, $n=8$; МСК — a group of males implanted with MSCs, $n=2$; MDA231 — a group of males subcutaneously injected with a line of breast adenocarcinoma cells, $n=4$. * — statistically significant differences, $p<0.05$.

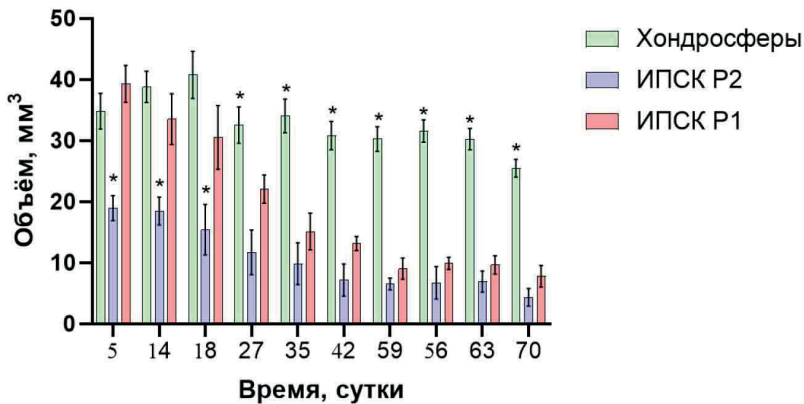


Рис. 3. Изменение медиан объёмов образований (мм^3) в месте введения у животных в опытных группах с течением времени на ранних сроках исследования. По оси абсцисс обозначены сутки после введения. Хондросферы — группа введения хондросфер на основе хондроцитов человека; ИПСК P2 — группа введения Хондросфер на основе ИПСК с нокаутом гена $\beta 2\text{m}$ и дифференцированных в хондрогенном направлении; ИПСК P1 — группа введения Хондросфер на основе ИПСК, дифференцированных в хондрогенном направлении; * — статистически значимые различия по сравнению с двумя другими группами, $p < 0,05$.

Fig. 3. Changes in the median volumes of formations (mm^3) at the injection site in animals in experimental groups over time in the early stages of the study. The abscissa indicates the day after administration. Chondrospheres — group of administration of Chondrospheres based on human chondrocytes; ИПСК P2 — group of administration of Chondrospheres based on iPSCs with knockout of gene $\beta 2\text{m}$ and differentiated in the chondrogenic direction; ИПСК P1 — group of administration of Chondrospheres based on iPSCs differentiated in the chondrogenic direction; * — statistically significant differences compared to the other two groups, $p < 0.05$.

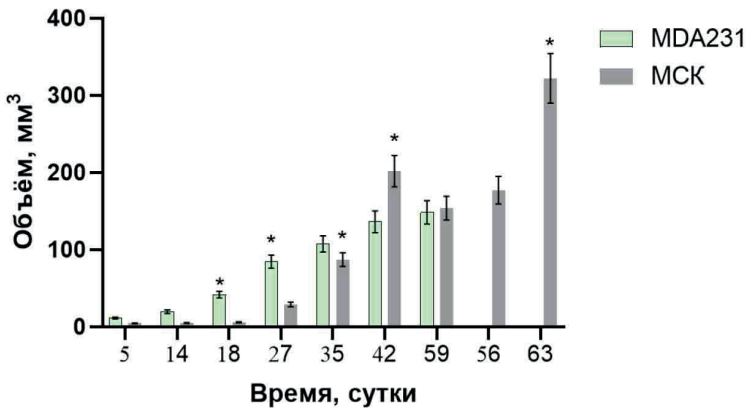


Рис. 4. Изменение медиан объёмов новообразований (мм^3) в месте введения у животных в положительных контрольных группах с течением времени на ранних сроках исследования. По оси абсцисс обозначены сутки после введения. MCK — подкожное введение линии MCK; MDA231 — подкожное введение линии клеток аденокарциномы молочной железы; * — статистически значимые различия по сравнению с предыдущим измерением, $p < 0,05$.

Fig. 4. Changes in the median volumes of neoplasms (mm^3) at the injection site in animals in positive control groups over time in the early stages of the study. The abscissa indicates the day after administration. MCK — subcutaneous injection of the MSCs line; MDA231 — subcutaneous injection of the breast adenocarcinoma cell line; * — statistically significant differences compared to the previous measurement, $p < 0.05$.

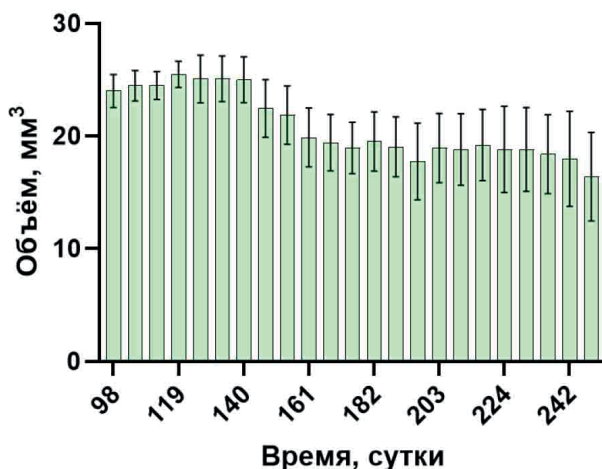


Рис. 5. Изменение медиан объёмов инокулятов (мм³) в месте введения у животных в опытной группе введения Хондросфер на основе хондроцитов человека с течением времени на поздних сроках исследования. По оси абсцисс обозначены сутки после введения.

Примечание: измерение объёмов образований в группах закола дифференцированных производных ИПСК не измерялись после 94-го дня эксперимента, поскольку визуально место закола не отличалось от окружающих тканей.

Fig. 5. Changes in the median volumes of inoculates (mm³) at the injection site in animals in the experimental group of administration of Chondrospheres based on human chondrocytes over time at the late stages of the study. The abscissa indicates the day after administration.

Note: the measurement of the volume of formations in the groups of administration of differentiated ISC derivatives was not measured after day 94 of the experiment, since visually the puncture site did not differ from the surrounding tissues.

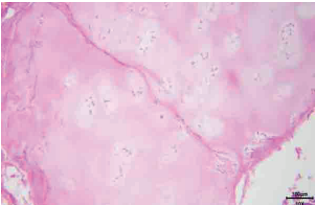
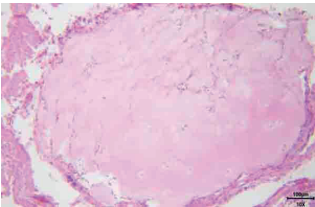
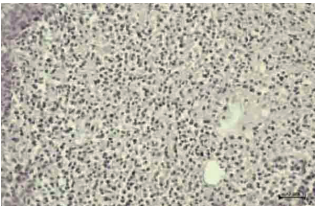
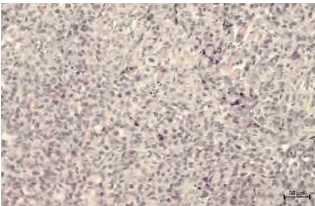
ских препаратах выявлена недифференцированная опухоль с выраженным клеточным и ядерным плеоморфизмом и несколькими митотическими фигурами. Кроме того, наблюдалось несколько областей с веретенообразными клетками. Обнаружены основные признаки десмопластической стромы, что характерно для рака молочной железы человека (табл. 3). В группе введения МСК гистологический анализ места имплантации выявил небольшие, полигональные клетки, имеющие нечёткие границы и плеоморфные перекрывающиеся ядра. Встречались митотические фигуры. Умеренное количество амфифильной и зернистой цитоплазмы. Таким образом, присутствовала большая часть признаков, позволяющих дифференцировать образец как опухолеподобное образование с преобладанием стволовых клеток (табл. 3).

Детекция ДНК человека в тканях и органах мыши

При анализе образцов цельной крови, образцов тканей и органов мышей из опытных групп ДНК человека была обнаружена только в области закола Хондросфер. В остальных тканях и органах самцов и самок мышей следов анализируемого ПТИ не было обнаружено (LOQ < 0,001 нг ДНК). Таким образом, характер биораспределения исследуемого продукта на ранних сроках наблюдения (через 3 мес. после введения) и на поздних сроках наблюдения (через 9 мес. после введения) оптимален для рекомендованного внутрисуставного пути введения. В группах подкожного введения опухолевой культуры или МСК человека человеческая ДНК была детектирована в месте введения и в тонком кишечнике.

Таблица 3. Гистологические препараты имплантатов на разных сроках после подкожного введения на сроке 3 мес. после имплантации. Увеличение — 10×, 20×. Масштабный отрезок — 100 мкм, 50 мкм

Table 3. Histological preparations of implants at different periods after subcutaneous injection at a period of 3 months after implantation. Magn. ×10, ×20. The scale segment is 100 μm, 50 μm

Группа	Метод окраски	
	Гематоксилин-эозин	Альциановый синий
Хондросферы на основе хондроцитов человека		
Хондросферы на основе ИПСК-производных		
Хондросферы на основе ИПСК-производных с нокаутом гена β2m		
MDA231		
МСК		

Обсуждение результатов

Получение трёхмерных сфероидных продуктов на основе аутологичных хондроцитов человека с помощью органоидной технологии является достаточно перспективным направлением для создания продуктов для регенеративной медицины. Подобные технологии активно применяются за рубежом для клеточной терапии объёмных очаговых дефектов гиалинового хряща коленного сустава. Несмотря на то, что разрабатываемый нами продукт аналогичен по технологии производства и по своему составу препарату от компании «Co.don», его получают по усовершенствованной технологии, что требует новых исследований безопасности. Согласно существующему в нашей стране законодательству в области обращения лекарственных препаратов, исследование фармакокинетики ПТИ включает анализ биораспределения, которое характеризует миграционный потенциал клеток в составе клеточного конструктора. Исследования биораспределения продукта Spherohx™ после консультации разработчика с регуляторными органами проводили на животных с иммунодефицитом [25]. Проведённое нами исследование биораспределения на иммунодефицитных мышах линии Balb/c Nude с использованием ПЦР с детекцией в агарозном геле показало отсутствие человеческой ДНК в тканях и органах, удалённых от зоны подкожной имплантации продукта. В опытных группах введения ПТИ на основе клеток человека человеческая ДНК была детектирована только в месте имплантации. В группах положительного контроля (подкожное введение опухолевой культуры или МСК человека) ДНК человека была детектирована в месте введения и в тонком кишечнике, что свидетельствует о повышенной миграционной активности данных линий клеток. Таким образом, в рамках тестирования безопасности проведение оценки биораспределения ПТИ, предназна-

ченного для имплантации человеку, представляется целесообразным с помощью описанного подхода.

Технология индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), которая позволяет легко получать клетки, способные к длительному самообновлению и способностью к дифференцировке в любой тип соматических клеток, в т. ч. хондроциты, может преодолеть ограничения, связанные с аутологичными хондроцитами [17]. Клеточные технологии, связанные с использованием ИПСК в качестве источника клеток для терапии повреждений хрящевой ткани, в настоящее время активно развиваются, но протоколы получения хондроцитарных производных из ИПСК и процессы их культивирования в 3D-условиях не унифицированы, а готовых продуктов из данных клеток на рынке не представлено [18]. Поскольку цель нашего исследования состояла в изучении биораспределения нового ПТИ для терапии поражений суставного хряща человека на основе ИПСК, дифференцированных в хондрогенном направлении, то клетки были проверены на наличие экспрессии хондроцитарных генов методом ПЦР.

Для изучения биораспределения использовали иммунодефицитных мышей линии Balb/c Nude. Данная линия животных широко используется в фундаментальных и доклинических исследованиях различных ксенотрансплантатов, в т. ч. на основе хондроцитов человека [4]. В своём исследовании мы прибегали к подкожной имплантации Хондросфер, поскольку эта процедура менее инвазивна, легко масштабируема и проста в реализации по сравнению с имплантацией в сустав мелких лабораторных животных, за зоной инокуляции легко наблюдать. Дозу однократного введения ПТИ рассчитывали, исходя из предполагаемой терапевтической дозы для человека согласно размеру дефектов хрящевой ткани — 10–70 сфероидов на 1 см² повреждённой

ткани [25]. Для мышей доза составила пять сфероидов на одно животное.

Морфометрические данные не выявили значительных изменений массы тела у опытных групп по сравнению с группой контроля, что говорит об отсутствии системного патологического действия исследуемого продукта. Размеры инокулятов с течением времени уменьшались, что свидетельствует об отсутствии гипертрофии и компактизации вводимого продукта, в связи с отсутствием механической нагрузки на имплантат. Кроме того, наблюдался значимо меньший объём образований в группах введения Хондросфер на основе ИПСК, дифференцированных в хондрогенном направлении, что может быть связано с изначально меньшим размером клеток. Влияния со стороны используемого протокола дифференцировки клеток не наблюдалось.

Для оценки формирования стабильной хрящевой ткани в месте введения ПТИ места закола были исследованы с помощью гистологического анализа. В результате анализа полученных препаратов мы наблюдали образование хрящевой ткани уже через 90 сут после имплантации, что говорит об успешной интеграции сфероидов в тканях мыши. Стоит заметить, что ПТИ на основе ИПСК-производных также формировали нормальную хрящевую ткань. На поздних сроках (через 9 мес.) хрящевые имплантаты также успешно формировали нормальную хрящевую ткань, что говорит об их состоятельности.

Для проверки распределения биоптаты органов и тканей мыши по прошествии 90 сут после имплантации были качественно оценены путём анализа на наличие экспрессии видоспецифичной для человека последовательности гена цитохром-С-оксидазы 1 (*COI*). Метод ПЦР является одним из методов выбора для исследования биораспределения продуктов на основе соматических клеток [25]. Согласно проведённым в мире исследованиям, детекция человече-

ской ДНК методом ПЦР в сочетании с другим методом визуализации распределения исследуемого препарата, например, с гистологией, является достаточным методологическим подходом для анализа биораспределения. Известно, что ПЦР является высокочувствительным методом анализа, который в некоторых случаях может обнаружить одну копию целевой ДНК, и поэтому разделение рабочих зон — выделения ДНК, подготовки смеси, детекции результатов — и контроль загрязнения на каждом этапе имеют решающее значение для лаборатории. Хотя это не обсуждается в этой статье, предполагается, что все манипуляции, связанные с проведением анализа ПЦР, соответствуют надлежащей лабораторной практике (GLP).

Выводы

В настоящей работе было проведено исследование биораспределения ПТИ «Хондросферы», представляющего собой 3D-структуру на основе хондроцитов человека. Альтернативным источником при изготовлении изучаемого ПТИ были выбраны ИПСК человека, дифференцированные в хондрогенном направлении. Биораспределение оценивали через 3 и 9 мес. после подкожной имплантации продукта мышам линии Balb/c Nude. В качестве контроля животным был введён физ. р-р. В ходе исследования в местах закола продукта наблюдали образование стабильной, зрелой хрящевой ткани с характерной морфологией без признаков аномальной пролиферации. Клеточная миграция за пределы области имплантации отсутствовала. Полученные результаты позволяют заключить, что разработанный нами ПТИ «Хондросферы» характеризуется нормальным биораспределением в пределах зоны введения, хорошо интегрируется в подлежащие ткани и может быть рекомендован для дальнейших исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Богомякова М.Е., Еремеев А.В., Лагарькова М.А. «Свой среди чужих»: можно ли создать гипоиммунотогенные линии плюрипотентных стволовых клеток? *Молекулярная биология*. 2019;53(5):725–740. [Bogomiakova M.E., Eremeev A.V., Lagarkova M.A. «Svoy sredi chuzhikh»: mozhno li sozdat' gipoimmunogennye linii pluryipotentnykh stvolovykh kletok? [At home among strangers: Is it possible to create hypoimmunogenic pluripotent stem cell lines?]. *Molekulyarnaya biologiya* [Molecular Biology]. 2019;53(5):725–740. (In Russian)]. DOI: 10.1134/S0026898419050045
2. Пикина А.С., Голубинская П.А., Ручко Е.С., Коженевская Е.В., Поспелов А.Д., Бабаев А.А., Еремеев А.В. Исследование биораспределения биомедицинского клеточного продукта на основе хондроцитов человека при имплантации мышам линии BALB/C Nude. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2023;4:123–130. [Pikina A.S., Golubinskaya P.A., Ruchko E.S., Kozhenevskaya E.V., Pospelov A.D., Babaev A.A., Eremeev A.V. Issledovanie bioraspredeleniya biomeditsinskogo kletochного produkta na osnove khondrotsitov cheloveka pri implantatsii mysham linii BALB/C Nude [Assessing biodistribution of biomedical cellular product based on human chondrocytes following implantation to BALB/C nude mic]. *Meditsina ekstremal'nykh situatsiy* [Extreme Medicine]. 2023;4:123–130. (In Russian)]. DOI: 10.47183/mes.2023.057
3. Abe K., Yamashita A., Morioka M., Horike N., Takei Y., Koyamatsu S., Okita K., Matsuda S., Tsumaki N. Engraftment of allogeneic iPSC cell-derived cartilage organoid in a primate model of articular cartilage defect. *Nat. Commun.* 2023;14(1):804. DOI: 10.1038/s41467-023-36408-0
4. Apelgren P., Amoroso M., Lindahl A., Brantsing C., Rotter N., Gatenholm P., Kölby L. Chondrocytes and stem cells in 3D-bioprinted structures create human cartilage in vivo. *PLoS One*. 2017;12(12): e0189428. DOI: 10.1371/journal.pone.0189428
5. Bogomiakova M.E., Sekretova E.K., Anufrieva K.S., Khabarova P.O., Kazakova A.N., Bobrovsky P.A., Grigoryeva T.V., Eremeev A.V., Lebedeva O.S., Bogomazova A.N., Lagarkova M.A. iPSC derived cells lack immune tolerance to autologous NK cells due to imbalance in ligands for activating and inhibitory NK-cell receptors. *Stem Cell Res Ther.* 2023;14(1):77. DOI: 10.1186/s13287-023-03308-5
6. Bogomiakova M.E., Sekretova E.K., Eremeev A.V., Shuvalova L.D., Bobrovsky P.A., Zerkalenkova E.A., Lebedeva O.S., Lagarkova M.A. Derivation of induced pluripotent stem cells line (RCPMi007-A-1) with inactivation of the beta-2-microglobulin gene by CRISPR/Cas9 genome editing. *Stem Cell Res.* 2021;55:102451. DOI: 10.1016/j.scr.2021.102451
7. Delanois R.E., Etcheson J.I., Sodhi N., Henn R.F., Gwam C.U., George N.E., Mont M.A. Biologic therapies for the treatment of knee osteoarthritis. *J. Arthroplasty*. 2019;34(4):801–813. DOI: 10.1016/j.arth.2018.12.001
8. Eremeev A., Belikova L., Ruchko E., Volovikov E., Zubkova O., Emelin A., Deev R., Lebedeva O., Bogomazova A., Lagarkova M. Brain organoid generation from induced pluripotent stem cells in home-made mini bioreactors. *J. Vis. Exp.* 2021;178. DOI: 10.3791/62987
9. Eremeev A., Pikina A., Ruchko Y., Bogomazova A. Clinical potential of cellular material sources in the generation of iPSC-based products for the regeneration of articular cartilage. *Int. J. Mol. Sci.* 2023;24(19):14408. DOI: 10.3390/ijms241914408
10. Fickert S., Gerwien P., Helmert B., Schattenberg T., Weckbach S., Kaszkin-Bettag M., Lehmann L. One-year clinical and radiological results of a prospective, investigator-initiated trial examining a novel, purely autologous 3-dimensional autologous chondrocyte transplantation product in the knee. *Cartilage*. 2012;3(1):27–42. DOI: 10.1177/1947603511417616
11. European Medicines Agency. *Spherex: Spheroids of human autologous matrix-associated chondrocytes*. URL: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/spherex>
12. Hwang J.J., Choi J., Rim Y.A., Nam Y., Ju J.H. Application of induced pluripotent stem cells for disease modeling and 3d model construction: Focus on osteoarthritis. *Cells*. 2021;10(11):3032. DOI: 10.3390/cells10113032
13. Jiang Y., Tuan R.S. Bioactivity of human adult stem cells and functional relevance of stem cell-derived extracellular matrix in chondrogenesis. *Stem Cell Res. Ther.* 2023;14(1):160. DOI: 10.1186/s13287-023-03392-7
14. Kawata M., Mori D., Kanke K., Hojo H., Ohba S., Chung U.I., Yano F., Masaki H., Otsu M., Nakauchi H., Tanaka S., Saito T. Simple and robust differentiation of human pluripotent stem cells toward chondrocytes by two small-molecule compounds. *Stem Cell Reports*. 2019;13(3):530–544. DOI: 10.1016/j.stemcr.2019.07.012
15. Kreuz P.C., Kalkreuth R.H., Niemeyer P., Uhl M., Erggelet C. Long-term clinical and MRI results of matrix-assisted autologous chondrocyte implantation for articular cartilage defects of the knee. *Cartilage*. 2019;10(3):305–313. DOI: 10.1177/1947603518756463
16. Madrid M., Sumen C., Aivio S., Saklayen N. Autologous induced pluripotent stem cell-based cell therapies: Promise, progress, and challenges. *Curr. Protoc.* 2021;1(3):e88. DOI: 10.1002/cpz1.88
17. Murphy C., Mobasheri A., Tăncos Z., Kobilák J., Dinnyés A. The potency of induced pluripotent stem cells in cartilage regeneration and osteoarthritis treatment. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2018;1079:55–68. DOI: 10.1007/5584_2017_141
18. Nakamura A., Murata D., Fujimoto R., Tamaki S., Nagata S., Ikeya M., Toguchida J., Nakayama K. Bio-3D printing iPSC-derived human chondrocytes for articular cartilage regeneration. *Biofabrication*. 2021;13(4). DOI: 10.1088/1758-5090/ac1c99

19. Niemeyer P., Laute V., Zinser W., John T., Becher C., Diehl P., Kolombe T., Fay J., Siebold R., Fickert S. Safety and efficacy of matrix-associated autologous chondrocyte implantation with spheroid technology is independent of spheroid dose after 4 years. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* 2020;28(4):1130–1143. DOI: 10.1007/s00167-019-05786-8
20. Price A.J., Alvand A., Troelsen A., Katz J.N., Hooper G., Gray A., Carr A., Beard D. Knee replacement. *Lancet.* 2018;392(10158):1672–1682. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)32344-4
21. Riedl M., Vadalà G., Papalia R., Denaro V. Three-dimensional, scaffold-free, autologous chondrocyte transplantation: A systematic review. *Orthop. J. Sports Med.* 2020;8(9):2325967120951152 DOI: 10.1177/2325967120951152
22. Shah S.S., Mithoefer K. Scientific developments and clinical applications utilizing chondrons and chondrocytes with matrix for cartilage repair. *Cartilage.* 2021;13(1_suppl):1195S–1205S. DOI: 10.1177/1947603520968884
23. Yamanaka S. Pluripotent stem cell-based cell therapy — promise and challenges. *Cell Stem Cell.* 2020;27(4):523–531. DOI: 10.1016/j.stem.2020.09.014
24. Yamashita A., Morioka M., Yahara Y., Okada M., Kobayashi T., Kuriyama S., Matsuda S., Tsumaki N. Generation of scaffoldless hyaline cartilaginous tissue from human iPSCs. *Stem Cell Reports.* 2015;4(3):404–418. DOI: 10.1016/j.stemcr.2015.01.016
25. Zscharnack M., Krause C., Aust G., Thümmel C., Peinemann F., Keller T., Smink J.J., Holland H., Somerson J.S., Knauer J., Schulz R.M., Lehmann J. Preclinical good laboratory practice-compliant safety study to evaluate biodistribution and tumorigenicity of a cartilage advanced therapy medicinal product (ATMP). *J. Transl. Med.* 2015;13:160. DOI: 10.1186/s12967-015-0517-x

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Голубинская Полина Александровна*, к.м.н., ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина ФМБА России»;
e-mail: polinapigeon@gmail.com

Polina A. Golubinskaya*, Cand. Sci. (Med.), Federal Scientific and Clinical Center of Physical and Chemical Medicine named after Yu.M. Lopukhin of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: polinapigeon@gmail.com

Пикина Арина Сергеевна, ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина ФМБА России»;
e-mail: arina.pikina@yandex.ru

Arina S. Pikina, Federal Scientific and Clinical Center of Physical and Chemical Medicine named after Yu.M. Lopukhin of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: arina.pikina@yandex.ru

Ручко Евгений Сергеевич, ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина ФМБА России»;
e-mail: ruchkoevgeny@yandex.ru

Eugene S. Ruchko, Federal Scientific and Clinical Center of Physical and Chemical Medicine named after Yu.M. Lopukhin of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: ruchkoevgeny@yandex.ru

Кожневская Евгения Владимировна, ФГАОУ ВО «Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»;
e-mail: kozhenevskaya@neuro.nnov.ru

Evgeniya V. Kozhenevskaya, Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod;
e-mail: kozhenevskaya@neuro.nnov.ru

Поспелов Антон Джонович, ФГАОУ ВО «Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»;
e-mail: eso103163@gmail.com

Anton Dz. Pospelov, Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod;
e-mail: eso103163@gmail.com

Бабаев Алексей Александрович, к.б.н., ФГАОУ ВО «Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»;

e-mail: babaev@unn.ru

Aleksej A. Babaev, Cand. Sci. (Biol.), Federal Scientific and Clinical Center of Physical and Chemical Medicine named after Yu.M. Lopukhin of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: babaev@unn.ru

Иванов Виктор Андреевич, ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина ФМБА России»;

e-mail: vanov.va@inbox.ru

Viktor A. Ivanov, Federal Scientific and Clinical Center of Physical and Chemical Medicine named after Yu.M. Lopukhin of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: vanov.va@inbox.ru

Беспярых Юлия Андреевна, к.б.н., ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина ФМБА России»;

e-mail: JuliaBes@rcpcm.org

Julia A. Bespyatykh, Cand. Sci. (Biol.), Federal Scientific and Clinical Center of Physical and Chemical Medicine named after Yu.M. Lopukhin of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: JuliaBes@rcpcm.org

Шнайдер Лев Сергеевич, к.м.н., ГБУЗ Московский Клинический Научный Центр им. А.С. Логинова ДЗМ;

e-mail: shnayderlev@gmail.com

Lev S. Shnayder, Cand. Sci. (Med.), Moscow Clinical Scientific Center named after A.S. Loginov of the Moscow Health Care Department;

e-mail: shnayderlev@gmail.com

Еремеев Артём Валерьевич, к.б.н., ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина ФМБА России»;

e-mail: art-eremeev@yandex.ru

Artem V. Ereemeev, Cand. Sci. (Biol.), Federal Scientific and Clinical Center of Physical and Chemical Medicine named after Yu.M. Lopukhin of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: art-eremeev@yandex.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

МОДЕЛЬ ОСТЕОАРТРИТА, ИНДУЦИРОВАННОГО МОНОЙОДАЦЕТАТОМ, У ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Р.А. Далевич^{1,2,*}, И.А. Дьяченко^{1,2}

¹ Пушчинский филиал ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет»
142290, Российская Федерация, Московская обл., Пушкино, просп. Науки, 3

² Филиал ФГБУН ГНЦ РФ Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН
142290, Российская Федерация, Московская обл., Пушкино, просп. Науки, 6

Разработка адекватной биомодели патологического состояния, сопоставимого с клиническим случаем, остаётся актуальной проблемой. Для изучения анальгетической, противовоспалительной активности потенциальных фармакологических веществ разработка модели воспаления с признаками дегенерации хрящевой ткани и болью, индуцированной воспалением, расширит возможности современных подходов. Модель артрита, индуцированного моноидоацетатом (МИА) («Sigma-Aldrich», США), осуществлялась на крысах, внутрисуставно вводили 3 мг МИА в 50 мкл стерильного физ. р-ра в правый коленный сустав. Оценку верификации модели проводили с использованием стандартной терапии нестероидными противовоспалительными средствами (мелоксикам, ибупрофен), введение проводили ежедневно с 3-го по 14-й день после МИА. Воспаление и поведенческие изменения, связанные с болью, оценивали на 3-й, 7-й и 14-й день. На 8-й и 15-й день крыс эвтаназировали и проводили сбор биологического материала (кровь и правый коленный сустав) для гистологического анализа. Измерение концентрации IL-1 β в синовиальной жидкости проводили на 8-е и 15-е сут после введения МИА в коленный сустав крыс. Однократное введение ибупрофена оказывает выраженное анальгетическое действие, не снижает силу хватания лапой, в которую вводили МИА, и предотвращает инвалидизацию животных. В отличие от ибупрофена, селективный ингибитор циклооксигеназы (ЦОГ2) – мелоксикам – способен только снизить механическую гиперчувствительность в тесте фон Фрея. Результаты однократного и курсового введения ингибиторов ЦОГ показали значительные сходства в болевых тестах, но при анализе уровня воспаления суставов регулярное введение исследуемых средств было более эффективным, чем разовое применение. При этом мелоксикам показал превосходство по сравнению с ибупрофеном. Результаты показаны после гистологического анализа коленного сустава, в который вводили МИА. Таким образом, разработана и охарактеризована модель остеоартрита, индуцированного МИА, на лабораторных животных.

Ключевые слова: остеоартрит, моноидоацетат, биомодель, мелоксикам, ибупрофен, крысы

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Далевич Р.А., Дьяченко И.А. Модель остеоартрита, индуцированного моноидоацетатом, у лабораторных животных. *Биомедицина*. 2024;20(3E):176–181. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-176-181>

Поступила 15.04.2024

Принята после доработки 30.09.2024

Опубликована 01.11.2024

MODEL OF MONOIODOACETATE-INDUCED OSTEOARTHRITIS IN LABORATORY ANIMALS

Renata A. Dalevich^{1,2,*}, Igor A. Dyachenko^{1,2}

¹ Pushchino Branch of the Russian Biotechnological University
142290, Russian Federation, Moscow Region, Pushchino, Nauki Ave., 3

² Branch of the Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry
of the Russian Academy of Sciences
142290, Russian Federation, Moscow Region, Pushchino, Nauki Ave., 6

The development of an adequate biomodel of a pathological condition, comparable to the observed clinical case, remains an urgent problem. In order to study the analgesic and anti-inflammatory activity of potential pharmacological substances, it is important to develop inflammation models with signs of cartilage tissue degeneration and pain induced by inflammation. This extends the capabilities of modern approaches. In this work, a model of arthritis induced by monoiodoacetate (MIA) (Sigma-Aldrich, USA) was carried out on rats. To that end, 3 mg of MIA in 50 µl of sterile saline solution was administered intra-articularly into the right knee joint. The model was verified using standard therapy with non-steroidal anti-inflammatory drugs (meloxicam, ibuprofen), which were administered daily from day 3 to day 14 after MIA. Inflammation and behavioral changes associated with pain were assessed on days 3, 7, and 14. On days 8 and 15, the rats were euthanized, and biological material (blood and right knee joint) was collected for histological analysis. The concentration of IL-1β in the synovial fluid was measured on days 8 and 15 after MIA administration to the knee joint of the rats. A single administration of ibuprofen had a pronounced analgesic activity, preventing disability and not weakening the grip strength of the paw into which MIA was administered. At the same time, the selective inhibitor of cyclooxygenase meloxicam was only capable of reducing mechanical hypersensitivity in a von Frey test. Therefore, the effects of a single and course administration were highly similar in terms of the level of influence in pain tests. However, regular administration of cyclooxygenase inhibitors reduced joint inflammation more effectively than a single dose. Meloxicam showed a higher efficiency than ibuprofen in reducing joint inflammation. The results are shown after histological analysis of the knee joint injected with MIA. Thus, a model of osteoarthritis induced by MIA in laboratory animals was developed and characterized.

Keywords: osteoarthritis, monoiodoacetate, biomodel, meloxicam, ibuprofen, rats

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

For citation: Dalevich R.A., Dyachenko I.A. Model of Monoiodoacetate-Induced Osteoarthritis in Laboratory Animals. *Journal Biomed.* 2024;20(3E):176–181. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-176-181>

Submitted 15.04.2024

Revised 30.09.2024

Published 01.11.2024

Введение

Артрит — воспалительное заболевание, характеризующееся деграцией поверхности суставов, постоянной болью и гипералгезией. Наиболее распространённым видом артрита является остеоартрит (ОА), от него страдает более 13% взрослого населения. ОА характеризуется прогрессирующей дегенерацией хряща сустава, что приводит к модификации периапфизарной кости,

синовиального сустава и адаптированных тканевых элементов [1, 6]. Традиционная терапия пациентов с ОА направлена на облегчение боли и основана на применении кортикостероидов и нестероидных противовоспалительных средств. Первичный выбор препаратов — ибупрофен и диклофенак, которые ингибируют изоформы циклооксигеназы ЦОГ-1 и ЦОГ-2, а также мелоксикам, преимущественно селективно блокирую-

ший ЦОГ-2, влияя на превращение арахидоновой кислоты в простагландины [10].

Разработка адекватной биомодели патологического состояния, сопоставимого с клиническим случаем, остаётся актуальной проблемой. Для изучения анальгетической, противовоспалительной активности потенциальных фармакологических веществ разработка модели воспаления с признаками дегенерации хрящевой ткани по типу остеоартрита расширит возможности поиска новых соединений, что и определило **цель** настоящей работы.

Материалы и методы

Модель остеоартрита, индуцированного моноиодацетатом (МИА) («Sigma-Aldrich», США), исследовалась на крысах, половозрелых самцах в возрасте 8 недель, масса тела которых на начало эксперимента составляла 213 ± 35 г. Животные были получены из Питомника лабораторных животных ФИБХ РАН (Московская обл., Пущино). Условия содержания соответствовали стандартам, указанным в «Руководстве по содержанию и использованию животных» («The Guide for Care and Use of Laboratory Animals»). Все манипуляции, проводимые на животных, были рассмотрены и одобрены Институтской комиссией ФИБХ РАН по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных (IACUC).

Анестезию экспериментальных и контрольных животных на 0-й день, перед манипуляциями, проводили зоветилом (20–40 мг/кг; «Sante Animale», Франция) и ксилазином (5–10 мг/кг; «Pharmamagis Ltd.»; Венгрия). Животным делали внутрисуставную инъекцию 3 мг МИА в 50 мкл стерильного физ. р-ра в правый коленный сустав. Контрольной группе внутрисуставно вводили такой же объём стерильного физ. р-ра. Левый сустав сохраняли интактным, как и в группах контроля. Тестируемые вещества вводили ежедневно с 3-го по 14-й день после

МИА. Физ. р-р вводили подкожно в объёме 2 мл/кг, мелоксикам (0,5 мг/кг; «Boehringer Ingelheim», Германия) — внутримышечно в объёме 0,3 мл/кг, ибупрофен (40 мг/кг; «Татхимфармпрепараты», Россия) — зондом в желудок в объёме 10 мл/кг.

Воспаление суставов и поведенческие изменения, связанные с болью, оценивали на 3-й, 7-й и 14-й день. На 8-й и 15-й день крыс эвтаназировали и проводили сбор биологического материала (кровь и правый коленный сустав) для гистологического анализа.

Боль после введения МИА оценивали с помощью следующих тестов: спонтанная двигательная активность (тест «Открытое поле»); термическая анальгезия (тест «Горячая пластина»); механическая ноцицепция (альгометр на основе пинчера); тест «Сила хвата»; механическая чувствительность (тест «Нити фон Фрея»); функциональная активность лап (тест «Распрямление веса между задними лапами»).

Результаты и их обсуждение

Остеоартрит — одно из наиболее распространённых заболеваний суставов, характеризующееся деградацией суставного хряща, склерозом субхондральной кости, вторичным синовитом и хронической болью в суставах, что значительно снижает качество жизни пациентов. Воспаление тканей, сопровождающееся болью, молекулярными и структурными изменениями внеклеточного матрикса, которые снижают гибкость суставов, — всё это является отличительными признаками ОА [7, 8]. Считается, что модель ОА, индуцированная моноиодацетатом (МИА), воспроизводит процессы ОА в клинической практике [2, 9]. Введение МИА в коленный сустав крысы вызывает воспаление и дегенеративные изменения (деградацию хряща, изменения субхондральной кости, синовитальное воспаление) [4, 5]. Болевые ощущения у животных в индуцированной МИА модели воспаления (боль при нагрузке, тактильная

аллодиния и механическая гипералгезия) отражают клинические признаки, характерные для пациентов, страдающих ОА [3].

Была изучена модель с валидацией данных, ибупрофеном (неселективный ингибитор ЦОГ-1 и -2) и мелоксикамом (селективный ингибитор ЦОГ-2).

На 3-й день после введения МИА оценивали воспаление суставов и поведение, связанное с болью, через 60 мин после первого введения тестируемого вещества / физ. р-ра. Ни мелоксикам, ни ибупрофен не смогли уменьшить воспаление после однократного введения. Все тестируемые соединения полностью предотвращали механическую гиперчувствительность после первого введения и на протяжении всего исследования. Ибупрофен достоверно изменял показатели в тесте инвалидности и улучшал силу хвата после однократного введения на 3-й день. Таким образом, однократное введение ибупрофена оказывает выраженную анальгетическую активность, предотвращая инвалидность и не ослабевая силу хватания лапой, в которую вводили МИА. Тогда как селективный ингибитор ЦОГ-2 мелоксикам был способен только снизить механическую гиперчувствительность в тесте фон Фрея.

Эффекты курсового введения тестируемых веществ оценивали на 7-й день (5 дней лечения) и 14-й день (12 дней лечения). Обнаружено значительное влияние МИА на механическую гиперчувствительность и нарушение силы хвата во все временные точки эксперимента. Диаметр суставов и функциональная активность в тесте инвалидности значительно различалась на 3-й и 7-й день. Фармакологическое лечение уменьшили диаметр сустава на 7-й день, подтверждая свою противовоспалительную активность. Многократное введение ибупрофена эффективно предотвращало функциональные нарушения в тесте инвалидности и силы хвата, тогда как мелоксикам был практически неэффективен.

Таким образом, эффекты однократного и курсового введения были очень схожи по уровню влияния в болевых тестах, но регулярное введение ингибиторов циклооксигеназы уменьшало воспаление суставов результативнее, чем однократная доза. Селективный ингибитор ЦОГ-2 показал безопасность, переносимость, а также эффективность в лечении ОА лучше, чем неселективные ингибиторы циклооксигеназы, — как в нашем эксперименте, так и в клинике [12]. Причина их эффективности — более выраженная активность в очаге воспаления. Мелоксикам показал гораздо большую эффективность, чем ибупрофен в уменьшении воспаления суставов после гистологического анализа коленного сустава, в который вводили МИА, следовательно, он может иметь больше преимуществ в лечении хронических заболеваний.

Провоспалительные молекулы (цитокины или нейропептиды) накапливаются в поражённых суставах во время ОА и взаимодействуют с рецепторами на сенсорных нейронах, опосредуя ноцицептивные и нейропатические болевые реакции. Роль IL-1 β в развитии и прогрессировании остеоартрита широко обсуждается. Он индуцирует экспрессию матриксной металлопротеиназы, ответственной за деградацию хряща при ОА, и подавляет синтез протеогликанов [11]. В хирургических моделях ОА IL-1 β однозначно участвует в развитии заболевания, особенно на ранних стадиях [11]. В наших экспериментах мы обнаружили повышение уровня IL-1 β после индукции ОА, но в литературе имеются и другие результаты, полученные в данной модели. Разнонаправленным было действие мелоксикама на концентрацию IL-1 β в синовиальной жидкости. Мелоксикам приводил к значительному снижению концентрации IL-1 β на ранней стадии развития ОА (8-е сут) и не влиял на неё на 15-е сут. Гистологический анализ выявил, что мелоксикам эффективно предотвращает воспалительные изменения

в суставе и защищает хрящ от разрушения, подавляя структурные изменения суставного хряща, которые наблюдаются во всех группах с 8-го по 15-й день.

Выводы

Таким образом, разработана и охарактеризована модель остеоартрита, индуцированного моноиодацетатом, на лаборатор-

ных животных. Полученные результаты с использованием стандартных нестероидных противовоспалительных средств позволили оценить и верифицировать модель как адекватную клиническим случаям. Дальнейшее использование разработанной биомодели позволит изучить в эксперименте новые фармакологически активные вещества.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Aspden R.M., Scheven B.A., Hutchison J.D. Osteoarthritis as a systemic disorder including stromal cell differentiation and lipid metabolism. *Lancet*. 2001;357(9262):1118–1120. DOI: 10.1016/S0140-6736(00)04264-1
2. Combe R., Bramwell S., Field M.J. The monosodium iodoacetate model of osteoarthritis: A model of chronic nociceptive pain in rats? *Neurosci. Lett*. 2004;370(2-3):236–240. DOI: 10.1016/j.neulet.2004.08.023
3. Fernihough J., Gentry C., Malcangio M., Fox A., Rediske J., Pellas T., Kidd B., Bevan S., Winter J. Pain related behaviour in two models of osteoarthritis in the rat knee. *Pain*. 2004;112(1-2):83–93. DOI: 10.1016/j.pain.2004.08.004
4. Guingamp C., Gegout-Pottie P., Philippe L., Terlain B., Netter P., Gillet P. Mono-iodoacetate-induced experimental osteoarthritis: A dose-response study of loss of mobility, morphology, and biochemistry. *Arthritis Rheum*. 1997;40(9):1670–1679. DOI: 10.1002/art.1780400917
5. Guzman R.E., Evans M.G., Bove S., Morenko B., Kilgore K. Mono-iodoacetate-induced histologic changes in subchondral bone and articular cartilage of rat femorotibial joints: An animal model of osteoarthritis. *Toxicol. Pathol*. 2003;31(6):619–624. DOI: 10.1080/01926230390241800
6. Liu-Bryan R., Terkeltaub R. Emerging regulators of the inflammatory process in osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol*. 2015;11(1):35–44. DOI: 10.1038/nr-rheum.2014.162
7. Martel-Pelletier J., Barr A.J., Cicuttini F.M., Conaghan P.G., Cooper C., Goldring M.B., Goldring S.R., Jones G., Teichtahl A.J., Pelletier J.P. Osteoarthritis. *Nat. Rev. Dis. Primers*. 2016;2:16072. DOI: 10.1038/nrdp.2016.72
8. Neogi D.S., Kumar A., Rijal L., Yadav C.S., Jaiman A., Nag H.L. Role of nonoperative treatment in managing degenerative tears of the medial meniscus posterior root. *J. Orthop. Traumatol*. 2013;14(3):193–199. DOI: 10.1007/s10195-013-0234-2
9. Pomonis J.D., Boulet J.M., Gottshall S.L., Phillips S., Sellers R., Bunton T., Walker K. Development and pharmacological characterization of a rat model of osteoarthritis pain. *Pain*. 2005;114(3):339–346. DOI: 10.1016/j.pain.2004.11.008
10. Rao P., Knaus E.E. Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): Cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond. *J. Pharm. Sci*. 2008;11(2):81s–110s. DOI: 10.18433/j3t886
11. Vincent A.T., Schiettekatte O., Goarant C., Neela V.K., Bernet E., Thibeaux R., Ismail N., Mohd Khalid M.K.N., Amran F., Masuzawa T., Nakao R., Amara Korba A., Bourhy P., Veyrier F.J., Picardeau M. Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. *PLoS Negl. Trop. Dis*. 2019;13(5):e0007270. DOI: 10.1371/journal.pntd.0007270
12. Yocum D., Castro W., Cornett M. Exercise, education, and behavioral modification as alternative therapy for pain and stress in rheumatic disease. *Rheum. Dis. Clin. North Am*. 2000;26(1):145–159. DOI: 10.1016/s0889-857x(05)70128-9

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Далевич Рената Амировна*, Пушкинский филиал ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет», Филиал ФГБУН ГНЦ РФ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН;
e-mail: rdalevich@bk.ru

Renata A. Dalevich*, Pushchino Branch of the Russian Biotechnological University, Branch of the Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: rdalevich@bk.ru

Дьяченко Игорь Александрович, д.б.н., доц.,
Пушинский филиал ФГБОУ ВО «Российский
биотехнологический университет», Филиал
ФГБУН ГНЦ РФ Институт биоорганиче-
ской химии им. академиков М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова РАН;
e-mail: dyachenko@bibch.ru

Igor A. Dyachenko, Dr. Sci. (Biol.), Assoc. Prof.,
Pushchino Branch of the Russian Biotechnological
University, Branch of the Shemyakin and Ovchin-
nikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Rus-
sian Academy of Sciences;

e-mail: dyachenko@bibch.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

МОДЕЛИРОВАНИЕ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ ПРИ ПОМОЩИ ЦИКЛОФОСФАМИДА

Е.М. Евгеньева^{1,*}, А.В. Черномордова², С.В. Оковитый¹, А.Н. Куликов²

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

197376, Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 14, лит. А

² ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет
им. академика И.П. Павлова» Минздрава России

197022, Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6–8

В статье представлены результаты воспроизведения циклофосфановой модели сердечной недостаточности. В исследовании использовались беспородные мыши массой 18–26 г на начало эксперимента. Все мыши были разделены на две группы по 10 животных. Первой группе вводили внутривенно циклофосфамид в дозе 15 мг/кг, пятикратно в течение 21 дня (1-й, 5-й, 10-й, 15-й и 21-й день). Вторая группа — интактные животные. На животных выполнялась ЭхоКГ дважды: исходно до эксперимента (1-я точка) и через неделю после последнего введения (2-я точка, 28-й день). Представленная экспериментальная модель может быть полезна для исследования методов профилактики лекарственной токсичности, а также как модель сердечной недостаточности с сохранённой фракцией выброса левого желудочка.

Ключевые слова: эхокардиография, нарушение функции сердца, поражение правого желудочка

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Евгеньева Е.М., Черномордова А.В., Оковитый С.В., Куликов А.Н. Моделирование сердечной недостаточности при помощи циклофосфамида. *Биомедицина*. 2024;20(3E):182–186. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-182-186>

Поступила 15.04.2024

Принята после доработки 05.08.2024

Опубликована 01.11.2024

MODELING OF HEART FAILURE WITH CYCLOPHOSPHAMIDE

Ekaterina M. Evgenieva^{1,*}, Alexandra V. Chernomordova²,
Sergey V. Okovityi¹, Alexander N. Kulikov²

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

² First Saint Petersburg State Medical University named after Academician I.P. Pavlov
of the Ministry of Health Care of Russia

197022, Russian Federation, Saint Petersburg, L'va Tolstogo Str., 6–8

The article presents the results of reproduction of the cyclophosphane model of heart failure. Outbred mice weighing 18–26 g at the onset of the experiment were used. All mice were divided into two groups with 10 animals in each. The first group was injected intraperitoneally with cyclophosphamide at a dose of 15 mg/kg, five times for 21 days (day 1, 5, 10, 15, and 21). The second group was intact animals. EchoCG was performed on the animals twice: baseline before the experiment (point 1) and one week after the last injection (point 2, day 28). The presented experimental model may be used for the study of drug toxicity prevention methods, as well as a model of heart failure with preserved left ventricular ejection fraction.

Keywords: echocardiography, heart dysfunction, right ventricle damage

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

For citation: Evgenieva E.M., Chernomordova A.V., Okovityi S.V., Kulikov A.N. Modeling of Heart Failure with Cyclophosphamide. *Journal Biomed.* 2024;20(3E):182–186. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-182-186>

Submitted 15.04.2024

Revised 05.08.2024

Published 01.11.2024

Введение

Сердечная недостаточность (СН) является одной из наиболее актуальных проблем современной медицины. СН характеризуется эпизодами обострений, приводящими к снижению качества жизни, повышению риска госпитализации и преждевременной смертности [1].

Несмотря на достижения в лечении, прогноз у этой группы больных остаётся неблагоприятным, что требует дальнейших исследований, направленных на поиски эффективных средств лечения СН. Внедрение новых методов требует достаточной доказательной базы, включающей доклинические исследования на экспериментальных моделях патологии у животных.

Циклофосамид — химиотерапевтическое средство (алкилирующий агент), вызывающее прямое повреждение эндотелия и кардиомиоцитов [5]. Воспроизведение кардиотоксического эффекта циклофосамида важно не только для моделирования СН, но и для исследования возможностей профилактики неблагоприятного воздействия данного лекарства на сердечно-сосудистую систему.

Цель работы — воспроизведение циклофосфановой модели СН у мышей и оценка её результативности с помощью эхокардиографии (ЭхоКГ).

Материалы и методы

В литературных источниках для моделирования СН используют следующие схемы: у мышей с внутрибрюшинным вве-

дением циклофосамида в дозе 200 мг/кг однократно [7], у крыс с пероральным введением циклофосамида в дозе 1,5 мг/мл 3 раза в неделю на протяжении 3 мес. [2]. Первая схема моделирования используется в экспериментах сроком не более недели, вторая — при возможностях длительного моделирования и наблюдения. Нами была предложена оригинальная схема моделирования СН, пригодная для средних сроков наблюдения.

В исследовании использовались беспородные мыши массой 18–26 г на начало эксперимента. Животных содержали в стандартных условиях вивария в соответствии с рекомендациями Коллегии Евразийской экономической комиссии от 14.11.2023 г. № 33 «О Руководстве по работе с лабораторными (экспериментальными) животными при проведении доклинических (неклинических) исследований».

Все мыши были разделены на две группы по 10 животных. Первой группе вводили внутрибрюшинно циклофосамид в дозе 15 мг/кг, пятикратно в течение 21 дня (1-й, 5-й, 10-й, 15-й и 21-й день). Вторую группу составили интактные животные.

На животных дважды выполнялось ЭхоКГ: исходно до эксперимента (1-я точка) и через неделю после последнего введения (2-я точка, 28-й день).

Исследование животных проводили под хлоралгидратным наркозом (350 мг/кг). При ЭхоКГ в М-режиме измеряли: конечные диастолический и систолический размеры левого желудочка (ЛЖ) (КДР, КСР,

мм); размер межжелудочковой перегородки в диастолу (МЖПд, мм), размер задней стенки в диастолу (ЗСд, мм). Рассчитывали: показатели сократимости ЛЖ — фракцию укорочения ($ФУ=(КДР-КСР)/КДР \times 100, \%$) и фракцию выброса ($ФВ=(КДО-КСО)/КДО \times 100, \%$) по Тейхольцу. В В-режиме измеряли: передне-задний размер левого предсердия (ЛП, мм), конечно-диастолический размер правого желудочка (ПЖ, мм), поперечные и вертикальные размеры левого и правого предсердий (ЛПп, ЛПдл, ППп, ППдл, мм), систолическую экскурсию митрального кольца (MAPSE, мм), систолическую экскурсию кольца трикуспидального клапана (TAPSE, мм).

Статистический анализ данных проводили с использованием программного пакета STATISTICA. При оценке значимости

различий между исследуемыми группами проверялась гипотеза о нормальности распределения признаков с помощью теста Шапиро — Уилка.

Для оценки различий между выборками с нормальным распределением применяли двусторонний дисперсионный анализ повторных измерений с последующим тестом множественного сравнения Тьюки HSD.

Результаты и их обсуждение

За период наблюдения у животных контрольной группы значимых изменений массы тела и данных ЭхоКГ не произошло. У животных опытной группы к моменту наступления 2-й контрольной точки отмечено значимое увеличение массы тела, увеличение внутренних размеров ЛЖ (КДР и КСР), уменьшение передне-заднего размера ЛП

Таблица. Динамика показателей ЭхоКГ в опытной и контрольной группах

Table. Dynamics of EchoCG indices in the experimental and control groups

Показатели	Фон		Модель	
	Циклофосфамид	Контроль	Циклофосфамид	Контроль
Масса, г	22,7±1,96	23,33±1,00	25,90±2,13 ¹	24,56±2,19
КДР ЛЖ, мм	3,34±0,23	3,62±0,35	3,6±0,26 ¹	3,61±0,33
КСР ЛЖ, мм	1,77±0,16	2,04±0,31	2,13±0,22 ¹	2,21±0,11
МЖПд	0,87±0,09	0,82±0,24	0,87±0,19	0,85±0,03
ЗСд	0,69±0,14	0,78±0,13	0,61±0,08	0,67±0,09
ФУ	46,87±4,10	44,66±6,01	41,5±1,11	40,36±5,22
ФВ (Т)	83,86±3,54	81,47±5,89	78,82±1,17	77,17±5,83
ПЖ, мм	1,77±0,05	1,83±0,22	1,83±0,15	1,93±0,22
ЛП, мм	2,18±0,21	1,99±0,18	1,85±0,20 ^{1,2}	2,19±0,11
MAPSE	0,82±0,17	0,68±0,04	0,59±0,08	0,86±0,15
TAPSE	1,13±0,11	1,06±0,08	0,77±0,09 ^{1,2}	1,05±0,11
ЛПп, мм	2,57±0,29	2,64±0,11	2,41±0,21	2,46±0,27
ЛПдл, мм	2,83±0,24	2,96±0,29	2,45±0,38	2,57±0,25
ППп, мм	1,85±0,2	1,99±0,19	1,97±0,14	1,93±0,19
ППдл, мм	2,22±0,14	2,38±0,15	2,14±0,28	2,2±0,17

Примечание: данные представлены в виде $M \pm m$, где M — среднее арифметическое значение показателя группы, m — среднеквадратическое отклонение. В надстрочном индексе: ¹ — $p < 0,01$ в сравнении с 1-й точкой группы циклофосфамида; ² — $p < 0,05$ в сравнении со 2-й точкой группы контроля.

Note: data are presented as $M \pm m$, where M — arithmetic mean of the group index, m — standard deviation. In superscript: ¹ — $p < 0.01$ in comparison with point 1 of cyclophosphamide group; ² — $p < 0.05$ in comparison with point 2 of control group.

и TAPSE (табл.). При этом размер левого предсердия и величина TAPSE у животных опытной группы оказались ниже, чем у мышей из группы контроля.

Увеличение ЛЖ и снижение сократимости ПЖ (снижение TAPSE) могут свидетельствовать о развитии циклофосамид-индуцированной кардиомиопатии, а рост массы тела животных — о возможной задержке жидкости, свойственной сердечной недостаточности. Отсутствие значимого снижения ФВ ЛЖ не противоречит понятию циклофосамид-индуцированной кардиотоксичности, т. к. хорошо известно, что у большинства пациентов с этим осложнением высокодозной химиотерапии наблюдается преимущественно диастолическая СН [6]. Увеличение размеров ЛЖ при неизменной толщине стенок предполагает увеличение массы миокарда ЛЖ, так-

же свойственное циклофосамидной кардиомиопатии [4].

Следует отметить, что нами впервые для оценки результативности «циклофосамидной» модели СН применена ЭхоКГ, которая может дать ценную информацию не только о ремоделировании сердца, но и о гемодинамике экспериментальных животных. Предыдущие модели опирались только на патоморфологические данные [3].

Закключение

Воспроизведена циклофосфановая модель сердечной недостаточности на мышах, для контроля результативности которой использована ЭхоКГ. Модель может быть полезна для исследования методов профилактики лекарственной токсичности, а также как модель сердечной недостаточности с сохранённой фракцией выброса левого желудочка.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Ларина В.Н., Кокорин В.А., Ларин В.Г., Лунев В.И., Суворова Н.А., Скиба И.К., Щербина Е.С. Декомпенсация хронической сердечной недостаточности: новый взгляд на проблему в свете обновлённого консенсуса экспертов Европейского общества кардиологов. *Российский кардиологический журнал*. 2023;28(12):5581. [Larina V.N., Kokorin V.A., Larin V.G., Lunev V.I., Suvorova N.A., Skiba I.K., Shcherbina E.S. Dekompensatsiya khronicheskoy serdechnoy nedostatochnosti: novyy vzglyad na problemu v svete obnovlennogo konsensusa ekspertov Evropeyskogo obshchestva kardiologov [Decompensated heart failure: a reconceptualization in the light of updated consensus statement of the European Society of Cardiology]. *Rossiyskiy kardiologicheskii zhurnal [Russian Journal of Cardiology]*. 2023;28(12):5581. (In Russian)]. DOI: 10.15829/1560-4071-2023-5581
2. Attia A.A., Sorour J.M., Mohamed N.A., Mansour T.T., Al-Eisa R.A., El-Shenawy N.S. Biochemical, histological, and ultrastructural studies of the protective role of vitamin E on cyclophosphamide-induced cardiotoxicity in male rats. *Biomedicines*. 2023;11(2):390. DOI: 10.3390/biomedicines11020390
3. Hassanein E.H.M., Abd El-Ghafar O.A.M., Ahmed M.A., Sayed A.M., Gad-Elrab W.M., Ajarem J.S., Allam A.A., Mahmoud A.M. Edaravone and aceto-vanillone upregulate Nrf2 and PI3K/Akt/mTOR signaling and prevent cyclophosphamide cardiotoxicity in rats. *Drug Des. Devel. Ther.* 2020;14:5275–5288. DOI: 10.2147/DDDT.S281854
4. Hopkins H.A., Betsill W.L. Jr., Hobson A.S., Looney W.B. Cyclophosphamide-induced cardiomyopathy in the rat. *Cancer Treat. Rep.* 1982;66(7): 1521–1527.
5. Iqbal A., Iqbal M.K., Sharma S., Ansari M.A., Najmi A.K., Ali S.M., Ali J., Haque S.E. Molecular mechanism involved in cyclophosphamide-induced cardiotoxicity: Old drug with a new vision. *Life Sciences*. 2019;218:112–131. DOI: 10.1016/j.lfs.2018.12.018
6. Lin C.J., Vader J.M., Slade M., DiPersio J.F., Westervelt P., Romee R. Cardiomyopathy in patients after posttransplant cyclophosphamide-based hematopoietic cell transplantation. *Cancer*. 2017;123(10): 1800–1809. DOI: 10.1002/cncr.30534
7. Liu K., Ren X.-M., You Q.-S., Gu M.-M., Wang F., Wang S., Ma C.-H., Li W.-N., Ye Q. Ameliorative effect of danggui-buxue decoction against cyclophosphamide-induced heart injury in mice. *BioMed Research International*. 2018;8503109:10. DOI: 10.1155/2018/8503109

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Евгеньева Екатерина Максимовна*, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России;

e-mail: ekaterina.evgenieva@spcpcu.ru

Ekaterina M. Evgenieva*, Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health Care of Russia;

e-mail: ekaterina.evgenieva@spcpcu.ru

Черномордова Александра Владимировна, ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова» Минздрава России;

e-mail: sasha_chernomord@mail.ru

Alexandra V. Chernomordova, First Saint Petersburg State Medical University named after Academician I.P. Pavlov of the Ministry of Health Care of Russia;

e-mail: sasha_chernomord@mail.ru

Оковитый Сергей Владимирович, д.м.н., проф., ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России;

e-mail: sergey.okovity@pharminnotech.com

Sergey V. Okovitiy, Dr. Sci. (Med.), Prof., Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health Care of Russia;

e-mail: sergey.okovity@pharminnotech.com

Куликов Александр Николаевич, д.м.н., проф., ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова» Минздрава России;

e-mail: ankulikov2005@yandex.ru

Alexander N. Kulikov, Dr. Sci. (Med.), Prof., First Saint Petersburg State Medical University named after Academician I.P. Pavlov of the Ministry of Health Care of Russia;

e-mail: ankulikov2005@yandex.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЭТМАБЕНА И ЭМПАГЛИФЛОЗИНА В МОНО- И КОМБИНИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

Д.Ю. Ивкин*, М.В. Краснова, Е.Д. Семивеличенко, А.А. Карпов,
В.Е. Ковансков, С.В. Оковитый

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

В нескольких исследованиях была продемонстрирована кардиотропная активность производного малоновой кислоты — этмабена, возможность применения эмпаглифлозина при хронической сердечной недостаточности доказана рядом доклинических и клинических исследований. Авторы провели сравнительную оценку эффективности препаратов в схемах монотерапии и комбинированного применения на модели экспериментальной хронической сердечной недостаточности у крыс. Наиболее эффективной схемой лечения оказалось применение этмабена, комбинирование его с эмпаглифлозином привело к снижению эффективности, вне зависимости от того, какой из этих препаратов являлся стартовым.

Ключевые слова: фракция укорочения, производное малоновой кислоты

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Ивкин Д.Ю., Краснова М.В., Семивеличенко Е.Д., Карпов А.А., Ковансков В.Е., Оковитый С.В. Сравнительная эффективность этмабена и эмпаглифлозина в моно- и комбинированной терапии экспериментальной хронической сердечной недостаточности. *Биомедицина*. 2024;20(3E):187–190. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-187-190>

Поступила 15.04.2024

Принята после доработки 05.08.2024

Опубликована 01.11.2024

COMPARATIVE EFFICACY OF ETMABEN AND EMPAGLIFLOZIN IN MONO- AND COMBINED THERAPY OF EXPERIMENTAL CHRONIC HEART FAILURE

Dmitry Yu. Ivkin*, Marina V. Krasnova, Evgeniy D. Semivelichenko, Andrew A. Karpov,
Vladislav E. Kovanskov, Sergey V. Okovitiy

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

The cardiotropic activity of etmaben, a malonic acid derivative, has been confirmed by a number of studies. The possibility of using empagliflozin in chronic heart failure has been proven in a number of preclinical and clinical studies. In this study, the efficacy of the drugs in monotherapy and combined use regimens is compared using a model of experimental chronic heart failure in rats. The most effective treatment regimen was found to be etmaben; its combination with empagliflozin led to a decrease in effectiveness, regardless of which of these drugs was the starting drug.

Keywords: shortening fraction, malonic acid derivative

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

For citation: Ivkin D.Yu., Krasnova M.V., Semivelichenko E.D., Karpov A.A., Kovanskov V.E., Okovityi S.V. Comparative Efficacy of Etmaben and Empagliflozin in Mono- and Combined Therapy of Experimental Chronic Heart Failure. *Journal Biomed.* 2024;20(3E):187–190. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-187-190>

Submitted 15.04.2024

Revised 05.08.2024

Published 01.11.2024

Введение

В проведённых ранее исследованиях этмабена в качестве референтных препаратов использовали мельдоний, триметазидин и этилметилгидроксипиридина сукцинат [2]. Дизайн исследований кардиотропного эффекта этмабена и эмпаглифлозина подразумевал оценку эффективности при монотерапии [1, 2, 5].

Целью работы явилось сравнительное изучение эффективности этмабена по отношению к фозиноприлу и эмпаглифлозину на первом этапе и комбинаций, полученных путём добавления эмпаглифлозина к этмабену и этмабена к эмпаглифлозину, — на втором.

Материалы и методы

Крысы-самцы породы Brown Norway Catholic Rats были получены путём размножения в виварии ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России, в работе с ними соблюдались все биоэтические нормы. Моделирование хронической сердечной недостаточности (ХСН) проводили по стандартной методике лигирования левой коронарной артерии [4]. Через 1 мес. после перевязки осуществляли рандомизацию животных, исходя из значения фракции укорочения (ФУ). Были сформированы четыре группы животных: группа 1 — патология без лечения (контроль, $n=10$); животные группы 2 получали 10 мг/кг фозиноприла ($n=10$); группа 3 — эмпаглифлозин

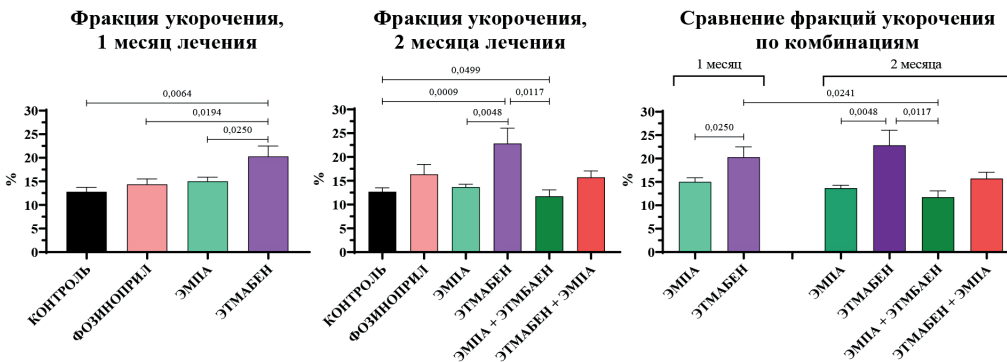


Рис. Результаты оценки фракции укорочения при терапии экспериментальной хронической сердечной недостаточности.

Fig. Assessment of the shortening fraction during treatment of experimental chronic heart failure

в дозе 1 мг/кг (n=20); группа 4 — этмабен в дозе 60 мг/кг (n=20). Через 1 мес. ежедневного перорального введения препаратов животных вводили в наркоз и повторно оценивали показатели эхокардиографического исследования. Животные группы 3 были повторно рандомизированы и разделены на две подгруппы: 3А — продолжали получать эмпаглифлозин, 3Б — добавление этмабена. Та же манипуляция была проведена с животными группы 4 — 4А продолжали получать этмабен, в 4Б добавлен эмпаглифлозин. После месяца терапии повторно проведено эхокардиографическое исследование.

Результаты исследований

Сравнение ФУ у животных разных групп представлено на рисунке. После введения препаратов в течение 1 мес. ФУ у животных группы этмабена значимо увеличилась по отношению к контролю и двум препаратам сравнения. Фозиноприл и эмпаглифлозин не вызывали значимого увеличения ФУ по сравнению с контролем.

В проведённых ранее исследованиях сходного дизайна значимый прирост фракции выброса и ФУ при терапии фозиноприлом и эмпаглифлозином наблюдался спустя 3 мес. от начала введения препаратов [5]. При этом введение эмпаглифлозина на этапе формирования ХСН позволяло повысить ФУ по сравнению с патологией без лечения [3]. Напротив, введение этмабена при формировании ХСН не вызывало значимого улучшения эхокардиографических показателей. Через 2 мес. продемонстрировано отсутствие синергизма между этмабеном и эмпаглифлозином вне зависимости от препарата стартовой терапии.

Выводы

На коротких сроках исследования (1 и 2 мес.) производное малоновой кислоты, этмабен, превосходил ингибитор ангиотензинпревращающего фермента фозиноприл и блокатор натрий-глюкозного ко-транспортера эмпаглифлозин, причём комбинация с последним не приводила к синергическим лекарственным взаимодействиям.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

- Ивкин Д.Ю., Карпов А.А. Экспериментальная оценка эффективности и безопасности нового производного пропандиовой кислоты с кардиотропным действием. *Биомедицина*. 2022;18(3):109–112. [Ivkin D.Yu., Karpov A.A. Eksperimental'naya otsenka effektivnosti i bezopasnosti novogo proizvodnogo propandiovoy kisloty s kardiotrofnym deystviem [Experimental evaluation of the effectiveness and safety of a new propandic acid derivative exhibiting cardiotropic action]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2022;18(3):109–112. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-18-3-109-112
- Ивкин Д.Ю., Карпов А.А., Драчева А.В., Питухина Н.Н., Ивкина А.С., Бурякина А.В., Теслев А.А. Влияние производного бензойной кислоты на формирование экспериментальной хронической сердечной недостаточности. *Фармация*. 2016; 63(4):49–52. [Ivkin D.Yu., Karpov A.A., Dracheva A.V., Pitukhina N.N., Ivkina A.S., Buryakina A.V., Teslev A.A. Vliyanie proizvodnogo benzoynoy kisloty na formirovanie eksperimental'noy khronicheskoy serdечноy nedostatochnosti [The influence of a benzoic acid derivative on the formation of experimental chronic heart failure]. *Farmatsiya [Pharmacy]*. 2016;63(4):49–52. (In Russian)].
- Ивкин Д.Ю., Краснова М.В., Оковитый С.В., Карпов А.А., Куликов А.Н., Елецкая Е.И. Об эффективности эмпаглифлозина в терапии экспериментального инфаркта миокарда. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(4): 136–145. [Ivkin D.Yu., Krasnova M.V., Okovity S.V., Karpov A.A., Kulikov A.N., Yeletskaia E.I. Ob effektivnosti empagliflozina v terapii eksperimental'nogo infarkta miokarda [Efficacy of empagliflozin in the treatment of experimental myocardial infarction]. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv [Drug development & registration]*. 2023;12(4):136–145. (In Russian)]. DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-4-1588
- Карпов А.А., Ивкин Д.Ю., Драчева А.В., Питухина Н.Н., Успенская Ю.К., Ваулина Д.Д., Усков И.С., Эйвазова Ш.Д., Минасян С.М., Власов Т.Д., Бурякина А.В., Галагудза М.М. Моделирование постинфарктной сердечной недостаточности путём окклюзии левой коронарной артерии у крыс: техника и методы морфофункциональной оценки. *Биомедицина*. 2014;3:32–

48. [Karpov A.A., Ivkin D.Yu., Dracheva A.V., Pitukhina N.N., Uspenskaya Yu.K., Vaulina D.D., Uskov I.S., Eyvazova Sh.D., Minasyan S.M., Vlasov T.D., Buryakina A.V., Galagudza M.M. Modelirovanie postinfarktnoy serdechnoy nedostochnosti putem okklyuzii levoy koronarnoy arterii u krys: tekhnika i metody morfofunktsional'noy otsenki [Rat model of post-infarct heart failure by left coronary artery occlusion: Technical aspects, func-

tional and morphological assessment]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2014;3:32–48. (In Russian)].

5. Krasnova M., Kulikov A., Okovityi S., Ivkin D., Karpov A., Kaschina E., Smirnov A. Comparative efficacy of empagliflozin and drugs of baseline therapy in post-infarct heart failure in normoglycemic rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 2020;393(9):1649–1658. DOI: 10.1007/s00210-020-01873-7

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Ивкин Дмитрий Юрьевич*, к.б.н., доц., ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России;
e-mail: dmitry.ivkin@pharminnotech.com

Dmitry Yu. Ivkin*, Cand. Sci. (Biol.), Assoc. Prof., Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: dmitry.ivkin@pharminnotech.com

Краснова Марина Викторовна, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России;
e-mail: marina.krasnova@pharminnotech.com

Marina V. Krasnova, Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: marina.krasnova@pharminnotech.com

Семивеличенко Евгений Дмитриевич, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России;
e-mail: evgeniy.semivelichenko@pharminnotech.com

Evgeniy D. Semivelichenko, Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: evgeniy.semivelichenko@pharminnotech.com

Карпов Андрей Александрович, к.м.н., ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России;
e-mail: a--karpoff@mail.ru

Andrew A. Karpov, Cand. Sci. (Med.), Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: a--karpoff@mail.ru

Ковансков Владислав Евгеньевич, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России;
e-mail: vladislav.kovanskov@spcpu.ru

Vladislav E. Kovanskov, Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: vladislav.kovanskov@spcpu.ru

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

Sergey V. Okovityi, Dr. Sci. (Med.), Prof., Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: sergey.okovity@pharminnotech.com

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

РЕПРОДУКТИВНЫЕ НАРУШЕНИЯ У МАТЕРЕЙ И ПОТОМСТВА КРЫС ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ГЕСТАЦИОННОГО ДИАБЕТА ВЫСОКОКАЛОРИЙНОЙ ДИЕТОЙ В СОЧЕТАНИИ С ТИЛОКСАПОЛОМ

К.С. Качалов*, А.С. Соломина, А.В. Родина

ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр оригинальных и перспективных биомедицинских
и фармацевтических технологий»

125315, Российская Федерация, Москва, Балтийская ул., 8

Отсутствие общепринятой модели гестационного диабета актуализирует задачу по её поиску и разработке. В эксперименте установлено, что содержание крыс популяции линий Wistar на высококалорийной диете в сочетании с введением тилоксапола при различных режимах во второй половине беременности приводит к нарушению толерантности к глюкозе, увеличению уровня ДНК-повреждений в органах потомства и отклонениям в постнатальном периоде развития. Предложенная модель может использоваться для поиска средств фармакологической коррекции репродуктивных нарушений при гестационном диабете.

Ключевые слова: гестационный диабет, высококалорийная диета, тилоксапол, ДНК-кометы, потомство, крысы

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Качалов К.С., Соломина А.С., Родина А.В. Репродуктивные нарушения у матерей и потомства крыс при моделировании гестационного диабета высококалорийной диетой в сочетании с тилоксаполом. *Биомедицина*. 2024;20(3E):191–196. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-191-196>

Поступила 15.04.2024

Принята после доработки 28.08.2024

Опубликована 01.11.2024

REPRODUCTIVE DISORDERS IN MOTHERS AND OFFSPRING OF RATS IN GESTATIONAL DIABETES MODELLED WITH A HIGH-CALORIE DIET IN COMBINATION WITH TYLOXAPOL

Kirill S. Kachalov*, Anna S. Solomina, Anastasia V. Rodina

Federal Research Center for Original and Promising Biomedical and Pharmaceutical Technologies
125315, Russian Federation, Moscow, Baltiyskaya Str., 8

The absence of a generally accepted model of gestational diabetes makes the task of its search and development highly relevant. The conducted experiments found that a high-calorie diet in combination with tyloxapol administration in various modes in the second half of pregnancy of Wistar rats leads to impaired glucose tolerance, an increase in the level of DNA damage in the organs of offspring, and deviations in the postnatal period of development. The proposed model can be used to search for pharmacological correction of reproductive disorders in gestational diabetes.

Keywords: gestational diabetes, high-calorie diet, tyloxapol, DNA comet assay, offspring, rats

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

For citation: Kachalov K.S., Solomina A.S., Rodina A.V. Reproductive Disorders in Mothers and Offspring of Rats in Gestational Diabetes Modelled with a High-Calorie Diet in Combination with Tyloxapol. *Journal Biomed.* 2024;20(3E):191–196. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-191-196>

Submitted 15.04.2024

Revised 28.08.2024

Published 01.11.2024

Введение

Гестационный сахарный диабет (ГСД) — нарушение обмена углеводов, впервые диагностируемое во время беременности и характеризующееся нарушением толерантности к глюкозе различной степени выраженности. По данным Международной Федерации диабета, ГСД ежегодно диагностируется у 17% беременных во всём мире [6]. К факторам риска развития ГСД относятся: сахарный диабет в семейном анамнезе или ГСД в анамнезе самой пациентки, малоподвижный образ жизни, высокоуглеводная диета, а также лишний вес и ожирение. Патогенез ГСД принципиально отличается от сахарного диабета 1-го и 2-го типа и связан с преходящими изменениями именно у беременных. Несмотря на обратимость гипергликемии при родоразрешении, ГСД индуцирует нарушения материнского организма (патологии родовой деятельности, риск развития заболеваний сердечно-сосудистой системы) и вызывает различные неврологические и метаболические отклонения у потомства [5, 7]. В основе указанных нарушений могут лежать выявляемые при ГСД первичные повреждения ДНК [2], которые в последнее время служат маркером различных патологий (в т. ч. сопровождающихся гипергликемией) и подлежат отдельной оценке.

На данный момент не существует общепринятой модели ГСД. Диабетогены аллоксан и стрептозотозин не позволяют воспроизвести поэтапность патогенеза и основные клинические проявления ГСД, что ставит задачу по изысканию новых путей для моделирования данного заболевания.

Цель работы — исследовать метаболические нарушения у матерей и фетотоксическое действие у потомства в антенатальном и постнатальном периоде при гестационном диабете, индуцированном высококалорийной диетой в сочетании с тилоксаполом.

Материалы и методы

Исследование проведено на самках крыс популяции линий Wistar ($n=42$; возраст 14 недель; масса тела не менее 220 г), полученных из Филиала «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России (Московская обл.). Животных содержали в виварии ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» в соответствии с ГОСТ 33215-2014. В начале эксперимента животных случайным образом разделяли на группы. Контрольная группа животных содержалась на стандартном корме и воде. Животных опытных групп содержали на высококалорийной диете (состоящей из корма с 60% животного жира) и 10%-ном р-ре сахарозы в качестве единственного источника жидкости, не менее 4 недель до беременности и на протяжении периода беременности длительностью не менее 3 недель. С 14-го дня беременности (ДБ) животным контрольной группы внутрибрюшинно вводили фосфатно-солевой буфер (ФСБ) с $pH=7,4$. Животным опытных групп вводили тилоксапол (Triton WR-1339), моделирующий гиперлипидемию за счёт ингибирования липопротеинлипазы и увеличения активности ГмГ-КоА-редуктазы и обладающий способностью обратимо и умеренно повышать уровень глюкозы в крови

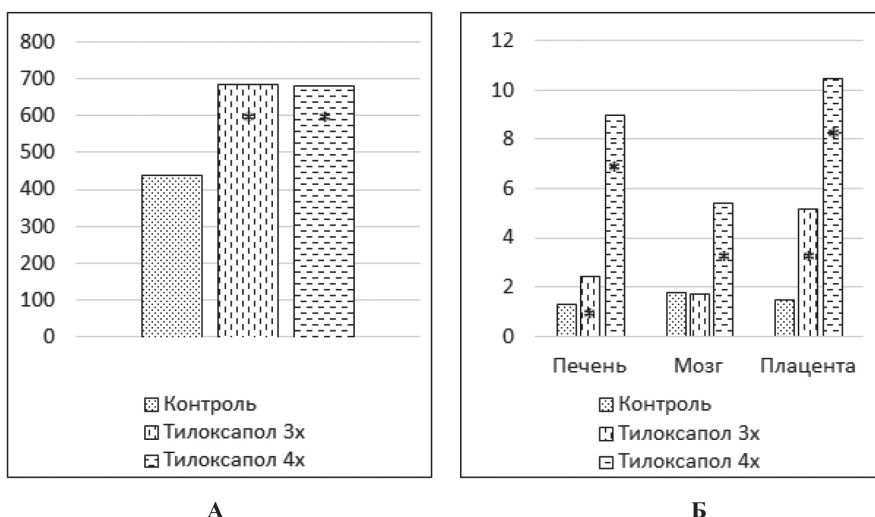


Рис. Внутривенный глюкозотолерантный тест: А — площадь под кривой (AUC) на 21-й день беременности; Б — ДНК-повреждения в тканях плодов.

Примечание: Тилоксапол 3× — трёхкратный режим введения тилоксаполя в дозе 200 мг/кг; Тилоксапол 4× — четырёхкратный режим введения тилоксаполя в дозе 200 мг/кг; данные представлены в виде медиан групп; * — статистически значимые различия при $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой.

Fig. Intravenous glucose tolerance test: А — area under the curve (AUC) on the 21st day of pregnancy; Б — DNA damage in fetal tissues.

Note: Tyloxapol 3× — three-time regimen of administration of tyloxapol at a dose of 200 mg/kg; Tyloxapol 4× — four-time regimen of administration of tyloxapol at a dose of 200 mg/kg; data are presented in the form of group medians; * — statistically significant differences at $p < 0.05$ compared with the control group.

грызунов [4]. Тилоксапол использовали в дозе 200 мг/кг в ФСБ (рН=7,4) трёхкратно (на 14-й, 17-й, 20-й ДБ) или четырёхкратно (на 14-й, 16-й, 18-й и 20-й ДБ). На 20-й день животных всех групп животных ограничивали в доступе к корму и содержали только на воде. На 21-й ДБ животным измеряли уровень глюкозы натошак (глюкометр «Diacont») и проводили внутривенный глюкозотолерантный тест (ВГТТ) с последующим расчётом площади под кривой (AUC) [3]. Одну часть самок декапитировали, и в ходе некропсии из каждого рога матки извлекали по одному плоду вместе с плацентой. Уровень ДНК-повреждений оценивали в образцах плаценты, печени и мозга плодов методом ДНК-комет в щелочной версии (с вычислением % ДНК в хвосте кометы) [1]. Другую часть самок оставляли на роды и наблюдали за выживаемостью потомства и его психо-поведенче-

ским статусом после 60-го дня жизни (ДЖ) в тестах «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ), «Распознавание нового объекта» (РНО), «Открытое поле» (ОП), «Экстраполяционное избавление» (ЭИ).

Для статистической обработки данных использовали ранговые критерии Манна — Уитни и Краскела — Уоллиса. Различия между группами считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследований

Содержание животных на ВКД в сочетании с тилоксаполом в дозе 200 мг/кг приводило к достоверному повышению уровня глюкозы в крови натошак при трёхкратном режиме до 5,6 ммоль/л, при четырёхкратном — до 7,6 ммоль/л (против 4,4 ммоль/л в контрольной группе). В результате проведения ВГТТ установлено сопоставимое нарушение толерантности к глюкозе

Таблица. Результаты проведения поведенческих тестов после 60-го дня жизни потомства
Table. Results of behavioral tests following 60 days of offspring life

Измеряемый показатель	Группа	Самки	Самцы
Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт»			
Нахождение в открытом рукаве, с	Контроль	136,9 [76,2÷216,6]	80,7 [32,6÷257,3]
	Тилоксапол 3×	52,1* [38,2÷63,3]	21,7* [8,4÷40,5]
Нахождение в закрытом рукаве, с	Контроль	83,7 [63,4÷148,8]	168,0 [38,8÷234,8]
	Тилоксапол 3×	230,9* [203,9÷245,2]	268,7* [214,4÷281,5]
Тест «Распознавание нового объекта»			
Индекс распознавания нового объекта	Контроль	63,5 [53,8÷73,9]	61,9 [61,2÷64,2]
	Тилоксапол 3×	49,5* [42,4÷57,2]	52,3* [37,8÷64,0]
Тест «Экстраполяционное извлечение»			
Время принятия решения	Контроль	3,0 [2,43÷9,1]	5,8 [3,8÷7,9]
	Тилоксапол 3×	23,6* [5,0÷60,0]	17,4* [13,3÷31,7]
Тест «Открытое поле»			
Горизонтальная двигательная активность	Контроль	57,5 [45,0÷67,0]	47,0 [39,0÷52,0]
	Тилоксапол 3×	34,0* [29,0÷47,0]	25,5* [13,0÷33,0]

Примечание: с — секунды; Тилоксапол 3× — трёхкратный режим введения тилоксаполя в дозе 200 мг/кг; данные представлены в виде медиан групп и 25% и 75% квартилей; * — статистически значимые различия при $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой.

Note: с — seconds; Tyloxapol 3× — three-time regimen of administration of tyloxapol at a dose of 200 mg/kg; data are presented in the form of group medians and 25% and 75% quartiles; * — statistically significant differences at $p < 0.05$ compared with the control group.

в опытных группах на 21-й ДБ (рис., А). При оценке генотоксичности в результате трёхкратного введения тилоксаполя было установлено значимое увеличение уровня ДНК-повреждений в плаценте и печени плодов, тогда как при четырёхкратном режиме введения тилоксаполя показатель поврежденности ДНК был значимо выше во всех исследуемых тканях (рис., Б). Полученные данные согласуются с клиническими наблюдениями, указывающими на увеличение поврежденности ДНК у матерей и новорождённых на фоне ГСД [2].

В раннем постнатальном периоде выживаемость потомства составила 100% в контрольной группе, в модели ГСД на фоне трёхкратного введения тилоксапо-

ла выживаемость составила 75%. При четырёхкратном введении тилоксаполя доля выживших крысят значимо снижалась (до 30%), что не позволило получить достаточное количество потомства обоего пола для проведения поведенческих тестов.

В модели ГСД при трёхкратном введении тилоксаполя — на фоне отсутствия ДНК-повреждений в мозге плодов — и самки, и самцы потомства демонстрировали значимое увеличение тревожности в тесте ПКЛ, снижение индекса распознавания нового объекта в тесте РНО, уменьшение исследовательской и горизонтальной двигательной активности в тесте ОП и увеличение времени принятия решения в тесте ЭИ (табл.).

Заключение

Сочетание высококалорийной диеты и тилоксапола в трёхкратном и четырёхкратном режиме вызывает значимую гипергликемию натошак и достоверное нарушение толерантности к глюкозе у самок крыс, увеличение уровня ДНК-повреждений в эмбриональных тканях и отклонения в пове-

дении у взрослого потомства. Полученные данные согласуются с клиническими проявлениями гестационного сахарного диабета, позволяя использовать предложенную модель для поиска и оценки эффективности фармакологических корректоров снижать репродуктивные нарушения при исследуемой патологии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Дурнев А.Д., Меркулов В.А., Жанатаев А.К., Никитина В.А., Воронина Е.С., Середенин С.Б. Методические рекомендации по оценке ДНК-повреждений методом щелочного гель-электрофореза отдельных клеток в фармакологических исследованиях. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая*. Под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К, 2012:115–128. [Durnev A.D., Merkulov V.A., Zhanataev A.K., Nikitina V.A., Voronina E.S., Seredenin S.B. Metodicheskie rekomendatsii po otsenke DНК-povrezhdeniy metodom shcheloch-nogo gel'-elektroforeza ot-del'nykh kletok v farmakologicheskikh issledovaniyakh [Methodological recommendations for the assessment of DNA damage by alkaline gel electrophoresis of individual cells in pharmacological studies]. *Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. Chast' pervaya* [Guidelines for conducting preclinical studies of medicines. Part One]. Ed. by A.N. Mironov. Moscow: Grif i K Publ., 2012:115–128. (In Russian)].
2. Ерёмина Н.В., Жанатаев А.К., Лисицын А.А., Дурнев А.Д. Генотоксические маркеры у больных сахарным диабетом (обзор литературы). *Экологическая генетика*. 2021;19(2):143–168. [Eremina N.V., Zhanataev A.K., Lisitsyn A.A., Durnev A.D. Genotoksicheskie markery u bol'nykh sakharnym diabetom (obzor literatury). *Ecological Genetics*. 2021;19(2):143–168. (In Russian)].
3. Спасов А.А., Воронкова М.П., Снигур Г.Л., Тибирькова Е.В., Проскурина И.А. Методические рекомендации по доклиническому изучению пероральных лекарственных средств для лечения сахарного диабета. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая*. Под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К, 2012:672–686. [Spasov A.A., Voronkova M.P., Snigur G.L., Tibir'kova E.V., Proskurina I.A. Metodicheskie rekomendatsii po doklinicheskomu izucheniyu peroral'nykh lekarstvennykh sredstv dlya lecheniya sakharnogo diabeta [Methodological recommendations for the preclinical study of oral medicines for the treatment of diabetes mellitus]. *Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. Chast' pervaya* [Guidelines for conducting preclinical studies of medicines. Part One]. Ed. by A.N. Mironov. Moscow: Grif i K Publ., 2012:672–686. (In Russian)].
4. De Sousa J.A., Pereira P., da Costa Allgayer M., Marroni N.P., Ferraz A.D.B.F., Picada J.N. Evaluation of DNA damage in Wistar rat tissues with hyperlipidemia induced by tyloxapol. *Exp. Mol. Pathol.* 2017;103(1):51–55. DOI: 10.1016/j.yexmp.2017.06.009
5. Plows J.F., Stanley J.L., Baker P.N., Reybolds C.M., Vickers M.H. The pathophysiology of gestational diabetes mellitus. *Int. J. Mol. Sci.* 2018;19(11):3342. DOI: 10.3390/ijms19113342
6. International Diabetes Federation.
7. Kc K., Shakya S., Zhang H. Gestational diabetes mellitus and macrosomia: A literature review. *Ann. Nutr. Metab.* 2015;66(Suppl. 2):14–20. DOI: 10.1159/000371628

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Качалов Кирилл Сергеевич*, ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий»;
e-mail: kachalov_ks@academpharm.ru

Kirill S. Kachalov*, Federal Research Center for Original and Promising Biomedical and Pharmaceutical Technologies;
e-mail: kachalov_ks@academpharm.ru

Соломина Анна Сергеевна, к.б.н., ФГБНУ
«Федеральный исследовательский центр оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий»;
e-mail: solomina_as@academpharm.ru

Anna S. Solomina, Cand. Sci. (Biol.), Federal Research Center for Original and Promising Biomedical and Pharmaceutical Technologies;
e-mail: solomina_as@academpharm.ru

Родина Анастасия Владимировна, ФГБНУ
«Федеральный исследовательский центр оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий»;
e-mail: rodina_av@academpharm.ru

Anastasia V. Rodina, Federal Research Center for Original and Promising Biomedical and Pharmaceutical Technologies;
e-mail: rodina_av@academpharm.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ТКАНЯХ ПЕЧЕНИ И СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ У МЫШЕЙ ЛИНИИ DB/DB РАЗНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП

Т.М. Матузок^{1,*}, В.А. Приходько¹, В.Е. Карев², О.В. Буюклинская¹, С.В. Оковитый¹

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

197376, Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 14, лит. А

² ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней ФМБА России»
197022, Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 9

Целью данной работы стало изучение патоморфологических изменений ткани печени и скелетных мышц у мышей линии C57Bl/Ks-db^{+/m} (db/db) разного возраста. Исследование было проведено на мышках-самках db/db в возрасте 3 мес. (n=7) и 7 мес. (n=5). По результатам гистоморфологического исследования не было обнаружено существенных различий между группами.

Ключевые слова: мыши db/db, печень, скелетные мышцы, старение, гистологический анализ

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Матузок Т.М., Приходько В.А., Карев В.Е., Буюклинская О.В., Оковитый С.В. Патоморфологические изменения в тканях печени и скелетных мышц у мышей линии db/db разных возрастных групп. *Биомедицина*. 2024;20(3E):197–201. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-197-201>

Поступила 15.04.2024

Принята после доработки 05.08.2024

Опубликована 01.11.2024

PATHOMORPHOLOGICAL CHANGES IN LIVER AND SKELETAL MUSCLE TISSUE IN DB/DB MICE OF DIFFERENT AGES

Tatyana M. Matuzok^{1,*}, Veronika A. Prikhodko¹, Vadim E. Karev²,
Olga V. Buyuklinskaya¹, Sergey V. Okovityi¹

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

² Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases
of the Federal Medical and Biological Agency of Russia
197022, Russian Federation, St. Petersburg, Professora Popova Str., 9

The present study was aimed at exploring the pathomorphological changes in liver and skeletal muscle tissue in C57Bl/Ks-db^{+/m} (db/db) mice of different ages. The study was conducted in female db/db mice aged 3 (n=7) or 7 months (n=5). According to the results of histomorphological examination, no significant differences were found between the groups.

Keywords: db/db mice, liver, skeletal muscle, aging, histological analysis

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

For citation: Matuzok T.M., Prikhodko V.A., Karev V.E., Buyuklinskaya O.V., Okovitiy S.V. Pathomorphological Changes in Liver and Skeletal Muscle Tissue in db/db Mice of Different Ages. *Journal Biomed.* 2024;20(3E):197–201. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-197-201>

Submitted 15.04.2024

Revised 05.08.2024

Published 01.11.2024

Введение

С увеличением числа пациентов с ожирением возрастает риск возникновения метаболических заболеваний, таких как неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП) и сахарный диабет 2-го типа (СД-2) [1]. Мыши линии C57Bl/Ks-db^{+/+}m (db/db) в связи с мутацией в гене рецептора лептина имеют лептинрезистентность, поэтому для них характерны гиперфагия, гипометаболизм, ожирение, с формированием к 4 мес. жизни СД-2. Использование этой линии как модели связывают со схожестью патогенеза СД-2 у db/db и человека. В то же время ожирение и инсулинорезистентность являются одними из основных факторов развития НАЖБП и саркопении [2, 4].

На прогрессирование НАЖБП и саркопении, помимо сопутствующих патологий, влияет естественное старение. Возрастные изменения сопровождаются укорочением теломера, что приводит к необратимой остановке клеточного роста, нарушениям пролиферации и аутофагии, повреждению ДНК не только самих клеток, но и митохондрий, что вызывает усугубление оксидативного стресса — одного из важных факторов патогенеза заболеваний [4].

В связи с указанным **целью** данного исследования стало изучение влияния процессов старения на гистоморфологические изменения печени и скелетных мышц у мышей линии db/db как модели СД-2.

Материалы и методы

Исследование проводили в соответствии с принципами Базельской декларации и Правилами надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического

союза в сфере обращения лекарственных средств после одобрения биоэтической комиссией ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России. Эксперименты были выполнены на 5 молодых взрослых (3 мес.; группа 3) и 7 взрослых (7 мес.; группа 7) мышах-самках линии C57Bl/Ks-db^{+/+}m массой 40–55 г, полученных из филиала «Столбовая» ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России» (Московская обл.). Мыши получали «Полнорационный комбикорм для лабораторных животных» (ООО «Лабораторкорм», Россия) и воду, соответствующую требованиям ГОСТ 2874-82 «Вода питьевая». Доступ к корму и воде был обеспечен *ad libitum*.

В течение 5 недель до конца эксперимента еженедельно измеряли массу тела мышей.

После проведения всех исследований животных выводили из эксперимента путём эвтаназии в атмосфере углекислого газа («Bioscape/Zoonlab GmbH», Германия) и забирали ткани печени и скелетных мышц нижней конечности для гистоморфологического анализа. Подготовленные образцы ткани окрашивали гематоксилином и эозином, пикрофуксином либо суданом III.

Для каждого образца ткани печени оценивали наличие и выраженность основных признаков поражения печени (воспаление по шкале METAVIR-A [2]; жировая дистрофия гепатоцитов; баллонная (белковая) дистрофия гепатоцитов; холестаз, некроз и фиброз), используя шкалу от 0 до 3, где 0 — отсутствие признака; 1 — слабовыраженный признак; 2 — умеренно выраженный признак; 3 — выраженный признак. В рамках оценки тяжести фибротических изменений по аналогичной шкале отдель-

но оценивали выраженность перипортального сегментарного фиброза, фиброза центральных вен, внутريدолькового перисинусоидального фиброза и наличие фиброзных септ. Стадирование фиброза печени осуществляли по шкале METAVIR-F [1]. Дополнительно оценивали наличие патологической клеточной инфильтрации паренхимы печени. Для каждого образца ткани скелетных мышц оценивали наличие и выраженность интерстициальной клеточной инфильтрации, пролиферативных изменений перимизия, интерстициального фиброза, некроза, дистрофических изменений и гипертрофии мышечных волокон, используя аналогичную шкалу.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Prism 9.0.0 («GraphPad Software», США). Нормальность распределения количественных признаков проверяли с помощью W-критерия Шапиро — Уилка. При нормальном распределении количественных признаков значимость различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента, при отличном от нормального распределении — с помощью U-критерия Манна

— Уитни. Порог статистической значимости устанавливали на уровне $p < 0,05$. Числовые данные представлены в виде средних арифметических с указанием стандартной ошибки средних. Для анализа балльных значений использовали программную среду R 4.1.1 («R Foundation for Statistical Computing», Австрия) с интегрированной средой разработки RStudio 1.4.1717 («Rstudio, PBC», США), а также пакет функций RVAideMemoire 0.9-81 [3]. Значимость различий между распределениями частот встречаемости шкалированных оценок оценивали с помощью расширенного точного теста Фишера с поправкой Холма — Бонферрони по описанному ранее протоколу [5].

Суммы баллов на графиках представлены в виде медианы и 95%-ного доверительного интервала (95% ДИ). Порог статистической значимости устанавливали на уровне $p < 0,05$.

Результаты исследований

За 5 недель наблюдения за животными был обнаружен статистически значимый прирост средней массы тела животных

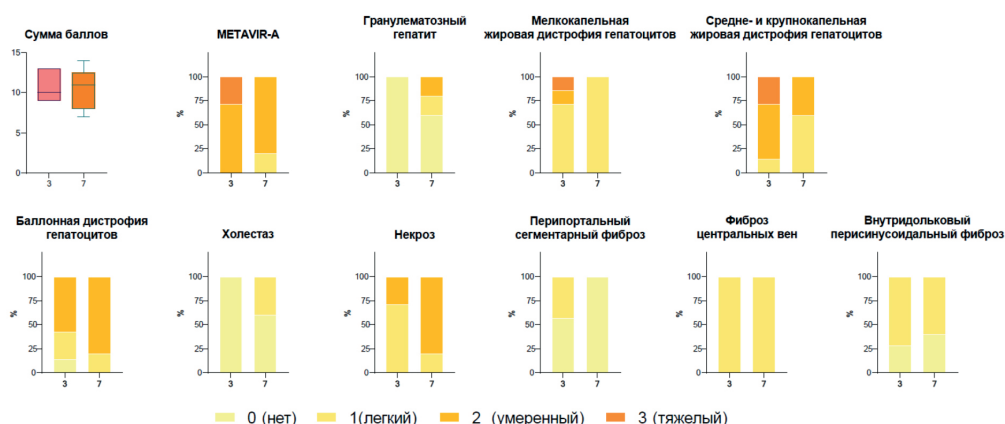


Рис. 1. Суммарные балльные оценки и распределение балльных оценок выраженности гистоморфологических признаков повреждения печени. 3 — группа мышей в возрасте 3 мес., 7 — группа мышей в возрасте 7 мес.
Fig. 1. Total scores and score distribution for the severity of histomorphological signs of liver damage. 3 — group of mice aged 3 months, 7 — group of mice aged 7 months.

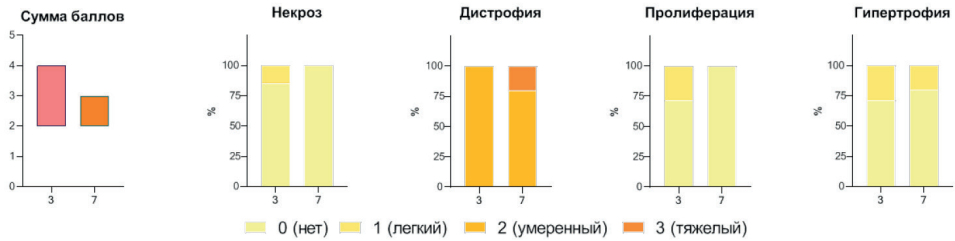


Рис. 2. Суммарные балльные оценки и распределение балльных оценок выраженности гистоморфологических признаков повреждения скелетных мышц нижних конечностей. 3 — группа мышей в возрасте 3 мес., 7 — группа мышей в возрасте 7 мес.

Fig. 2. Total scores and score distribution for the severity of histomorphological signs of damage to skeletal muscles of the lower extremities. 3 — group of mice aged 3 months, 7 — group of mice aged 7 months.

в группе 3 — с $42,92 \pm 1,66$ до $49,14 \pm 1,68$ г ($p < 0,05$) и в группе 7 — с $47,40 \pm 1,2$ до $52,76 \pm 1,36$ г ($p < 0,05$). Разница в массах между группами не была статистически значимой.

У всех животных наблюдалась баллонная (белковая) дистрофия гепатоцитов различной степени выраженности. В гепатоцитах большинства животных обнаруживались мелкие вакуоли, депонирующие нейтральные жиры, а также средне- и крупноклеточная жировая дистрофия гепатоцитов, наиболее выраженная у животных из группы 7. У всех испытуемых обнаружены различной степени выраженности повреждения паренхимы печени, условно соответствующие преимущественно умеренной и реже высокой гистологической активности гепатита. Также у большинства животных обеих групп отмечались явления фиброза, соответствующие 1 баллу по шкале METAVIR-F, преимущественно в виде нерезко выраженного расширения

стромы большинства портальных трактов. Медианная суммарная оценка в группе 3 составила 11 баллов (95% ДИ: 9–13), в группе 7 — также 11 баллов (95% ДИ: 7–14) (рис. 1).

Патологические изменения скелетных мышц прослеживались у большинства животных обеих групп. Жировая дистрофия с мелкогранулярной депозицией нейтральных жиров в саркомерме отмечалась у большинства животных, однако наиболее выраженной была в группе 3. Компенсаторная гипертрофия части мышечных волокон обнаруживалась редко. Медианная суммарная оценка в группе 3 составила 2 балла (95% ДИ: 2–4), в группе 7 — также 2 балла (95% ДИ: 2–3) (рис. 2).

Выводы

У мышей линии db/db в возрасте 3 и 7 мес. не выявлено значимых различий патоморфологических изменений печени и скелетных мышц нижних конечностей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Bedossa P., Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology*. 1996;24(2):289–293. DOI: 10.1002/hep.510240201
2. Dalbøge L.S., Almholst D.L., Neerup T.S., Vassiliadis E., Vrang N., Pedersen L., Fosgerau K., Jelsing J. Characterisation of age-dependent beta cell dynamics in the male db/db mice. *PLoS One*. 2013;8(12):e82813. DOI: 10.1371/journal.pone.0082813

3. Hervé M. RVAideMemoire: Testing and plotting procedures for biostatistics. R Package Version 0.9-81-2. Available online. 2021.
4. Ogawa S., Yakabe M., Akishita M. Age-related sarcopenia and its pathophysiological bases. *Inflamm Regener.* 2016;36:17. DOI: 10.1186/s41232-016-0022-5
5. Prikhodko V.A., Karev V.E., Sysoev Y.I., Ivkin D.Y., Okovityi S.V. A simple algorithm for semiquantitative analysis of scored histology data in the R environment, on the example of murine non-alcoholic steatohepatitis pharmacotherapy. *Livers.* 2022;2(4):412–424. DOI: 10.3390/livers2040031

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Матузок Татьяна Максимовна*, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России;
e-mail: matuzok.tatyana@pharminnotech.com

Приходько Вероника Александровна, к.б.н., ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России;
e-mail: veronika.prihodko@pharminnotech.com

Карев Вадим Евгеньевич, д.м.н., проф., ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней ФМБА России»;
e-mail: vadimkarev@yandex.ru

Буюклинская Ольга Владимировна, д.м.н., доц., ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России;
e-mail: olga.buyklinskaya@pharminnotech.com

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

Tatyana M. Matuzok*, Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: matuzok.tatyana@pharminnotech.com

Veronika A. Prikhodko, Cand. Sci. (Biol.), Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: veronika.prihodko@pharminnotech.com

Vadim E. Karev, Dr. Sci. (Med.), Prof., Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: vadimkarev@yandex.ru

Olga V. Buyuklinskaya, Dr. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: olga.buyklinskaya@pharminnotech.com

Sergey V. Okovityi, Dr. Sci. (Med.), Prof., Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: sergey.okovity@pharminnotech.com

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

ИЗУЧЕНИЕ СТРЕСС-ПРОТЕКТОРНЫХ СВОЙСТВ ПЕПТИДА АРНСЗ В ТЕСТЕ «ПРИПОДНЯТЫЙ КРЕСТООБРАЗНЫЙ ЛАБИРИНТ» НА МЫШАХ ICR

В.М. Павлов^{1,2,*}, А.Ю. Федотова^{1,2}

¹ Филиал ФГБУН ГНЦ РФ Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН
142290, Российская Федерация, Московская обл., Пушкино, просп. Науки, 6

² Пушкинский филиал ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет»
142290, Российская Федерация, Московская обл., Пушкино, просп. Науки, 3

TRPV1, играющий ключевую роль в передаче болевых сигналов, широко распространён в различных тканях и клетках, включая ЦНС. Активация или подавление TRPV1 влияет на нейронную десенсибилизацию, трансмиссию болевых сигналов и регуляцию нейротрансмиттерных систем. Пептид АРНСЗ, как селективный антагонист TRPV1, используется для исследования эффектов блокады этого канала на тревожность и реакцию на стресс у мышей. Результаты работы могут свидетельствовать о влиянии TRPV1 на формирование эмоциональных состояний. Представленное исследование важно для понимания влияния TRPV1 каналов на стресс у мышей ICR и имеет потенциал для дальнейших исследований в области биомедицины и биомоделирования.

Ключевые слова: TRPV1, АРНСЗ, стресс, мыши ICR, *in vivo*

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: данная работа финансировалась за счёт средств бюджета лаборатории биологических испытаний Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.

Для цитирования: Павлов В.М., Федотова А.Ю. Изучение стресс-протекторных свойств пептида АРНСЗ в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» на мышах ICR. *Биомедицина*. 2024;20(3E):202–205. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-202-205>

Поступила 15.04.2024

Принята после доработки 22.07.2024

Опубликована 01.11.2024

STRESS-PROTECTIVE PROPERTIES OF THE APHC3 PEPTIDE IN AN ELEVATED CROSS-SHAPED MAZE TEST IN ICR MICE

Vladimir M. Pavlov^{1,2,*}, Anastasia Yu. Fedotova^{1,2}

¹ Branch of the Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry
of the Russian Academy of Sciences
142290, Russian Federation, Moscow Region, Pushchino, Nauki Ave., 6

² Pushchino Branch of the Russian Biotechnological University
142290, Russian Federation, Moscow Region, Pushchino, Nauki Ave., 3

TRPV1, which plays a key role in transmitting pain signals, is widely distributed in various tissues and cells, including the central nervous system. Activation or suppression of TRPV1 influences neuronal desensitization, pain signal transmission, and regulation of neurotransmitter systems. The APHC3 peptide, as a selective antagonist of TRPV1, is used to investigate the effects of blocking this channel in terms of anxiety

and stress response in mice. The results of studies can indicate the influence of TRPV1 on the formation of emotional states. This study is important for understanding the impact of TRPV1 channels on stress in ICR mice, being promising for further research in the field of biomedicine and biomodeling.

Keywords: TRPV1, APHC3, stress, ICR mice, *in vivo*

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

Funding: this work was funded from the budget of the Laboratory of Biological Tests of the Branch of the Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences.

For citation: Pavlov V.M., Fedotova A.Yu. Stress-Protective Properties of the APHC3 Peptide in an Elevated Cross-Shaped Maze Test in ICR Mice. *Journal Biomed.* 2024;20(3E):202–205. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-202-205>

Submitted 15.04.2024

Revised 22.07.2024

Published 01.11.2024

Введение

TRPV1 (или транзистентный рецепторный потенциал ваниллоидного типа 1) — это нейрональный канал, который играет ключевую роль в передаче болевых сигналов. Он является белковым ионным каналом, который специфично реагирует на различные физические и химические стимулы, включая высокую температуру, низкий pH, а также экзо- и эндогенные регуляторы активности [11]. К эндогенным агонистам относятся производные полиненасыщенных жирных кислот, окситоцин, а к экзогенным — капсаицин. К антагонистам относятся пищевые омега-3 жирные кислоты, полиамины [1].

TRPV1 распространён в различных тканях и клетках, включая нейронные узлы дорсального ганглия, гипоталамуса, гиппокампа, коры мозга и других участков ЦНС. Его активация приводит к десенсибилизации нейронов, изменению трансмиссии болевых сигналов и регуляции нейротрансмиттерных систем [7]. Подавление активности TRPV1 в центральной нервной системе с помощью введения антагониста этого канала в медиальную префронтальную кору приводит к снижению уровня тревоги у крыс [3]. Мыши, у которых отсутствует ген *TRPV1*, проявляют меньше тревожности и реагируют слабее на страх по сравнению с обычными мышами. Это связано

с уменьшением долгосрочной потенциации, что указывает на важное влияние *TRPV1* на формирование чувства страха [5].

В нашем исследовании в качестве исследуемого вещества использовался пептид APHC3, который является селективным антагонистом TRPV1 канала. Исследования показали, что введение этого пептида оказывает противовоспалительное и обезболивающее действие на моделях ревматоидного и остеоартрита, острой и хронической боли [4, 9, 10]. Пептид APHC3 был выделен из морской анемоны *Heteractis crispa* [9]. В исследованиях *in vitro* у данного пептида наблюдалась нейропротективная активность на моделях нейродегенерации [8].

Материалы и методы

В исследованиях был использован пептид APHC3, который был получен путём гетерологической экспрессии в *E. coli* [6].

Исследование проведено на базе Лаборатории биологических испытаний Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. В основе дизайна исследования лежали рекомендации «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [2]. Для проведения исследования было взято 16 самцов белых половозрелых мышей аутбредной линии ICR статуса SPF массой тела 20–30 г, воз-

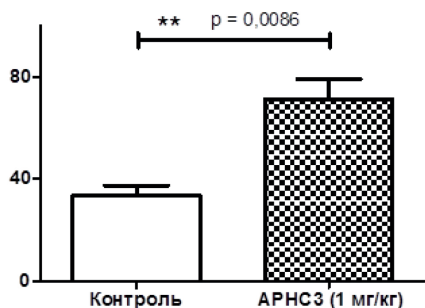


Рис. Результаты теста «Приподнятый крестообразный лабиринт». Время пребывания в открытых зонах. Результаты представлены как среднее значение $\pm$ SD; ** — $p < 0,01$ по сравнению с группой контроля (непараметрический тест Манна — Уитни).

Fig. The results of an elevated cross-shaped maze test. Time spent in open areas. The results are presented as an average value $\pm$ SD; ** — $p < 0,01$ compared with the control group (nonparametric Mann–Whitney test).

раст 7–8 недель (НПП Питомник лабораторных животных ФИБХ РАН, Московская обл.). Животные размещались по 4 особи в поликарбонатные клетки (тип 3, размеры 425×266×155 мм).

Животных разделили на две группы по 8 животных в соответствии с вводимыми препаратами. Животным из группы 1 вводили физ. р-р («Обновление», Россия), а животным из группы 2 — АРНСЗ в дозе 1 мг/кг. Всем группам животных тестируемые препараты вводились внутримышечно в объёме 2 мл/кг.

Функциональный тест проводился через 30 мин после введения веществ.

Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт» используется для изучения уровня тревожности у грызунов на основе их инстинктивных предпочтений к тёмным норам, страха перед открытыми пространствами и высотой. В рамках этого теста измеряются количество выходов и время пребывания животных в открытых секциях лабиринта.

Результаты исследований

В тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» наблюдалось естественное стремление животных контрольной группы к нахождению в закрытых лучах и меньшее количество посещений открытых лучей. При анализе воздействия АРНСЗ на взаимодействие животных с открытыми зонами площадки было отмечено повышение данного показателя у опытных животных, которые получали дозу 1 мг/кг АРНСЗ, на 110,5% по сравнению с контрольной группой.

Выводы

В результате исследования было обнаружено, что пептид АРНСЗ, который является селективным ингибитором TRPV1 канала, проявляет анксиолитическую активность при внутримышечном введении в дозе 1 мг/кг. Было обнаружено, что данный пептид снижает уровень тревожности у животных, что важно для дальнейших исследований и поиска эффективных доз.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Гладких И.Н., Синцова О.В., Лейченко Е.В., Козлов С.А. Ионный канал TRPV1: структурные особенности, модуляторы активности, терапевтический потенциал. *Успехи биологической химии*. 2021;61:107–154. [Gladkikh I.N., Sintsova O.V., Leichenko E.V., Kozlov S.A. Ionnyy kanal TRPV1: strukturnye osobennosti, modulatory aktivnosti, terapevticheskiy potentsial [TRPV1 ion channel: structural features, activity modulators, therapeutic potential]. *Uspekhi biologicheskoy khimii* [Advances in Biological Chemistry]. 2021;61:107–154. (In Russian)].
2. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К., 2012. [*Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv* [Guidelines for conducting preclinical studies of medicines]. Ed. by A.N. Mironov. Moscow: Grif i K. Publ. 2012. (In Russian)].
3. Aguiar D.C., Terzian A.L., Guimarães F.S., Moreira F.A. Anxiolytic-like effects induced by blockade of transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) channels in the medial prefrontal cortex of rats.

- Psychopharmacology (Berl.)*. 2009;205(2):217–225. DOI: 10.1007/s00213-009-1532-5
4. Andreev Ya.A., Kozlov S.A., Korolkova Y.V., Dyachenko I.A., Bondarenko D.A., Skobtsov D.I., Murashev A.N., Kotova P.D., Rogachevskaja O.A., Kabanova N.V., Kolesnikov S.S., Grishin E.V. Polypeptide modulators of TRPV1 produce analgesia without hyperthermia. *Mar. Drugs*. 2013;11(12):5100–5115. DOI: 10.3390/md11125100.
 5. Brown T.E., Chirila A.M., Schrank B.R., Kauer J.A. Loss of interneuron LTD and attenuated pyramidal cell LTP in Trpv1 and Trpv3 KO mice. *Hippocampus*. 2013;23(8):662–671. DOI: 10.1002/hipo.22125
 6. Esipov R.S., Makarov D.A., Stepanenko V.N., Kostromina M.A., Muravyova T.I., Andreev Y.A., Dyachenko I.A., Kozlov S.A., Grishin E.V. Pilot production of the recombinant peptide toxin of *Heteractis crispata* as a potential analgesic by intein-mediated technology. *Protein Expr. Purif.* 2018;145:71–76. DOI: 10.1016/j.pep.2017.12.011
 7. Ho K.W., Ward N.J., Calkins D.J. TRPV1: A stress response protein in the central nervous system. *Am. J. Neurodegener. Dis.* 2012;1(1):1–14.
 8. Kolesova Y.S., Stroylova Y.Y., Maleeva E.E., Moysenovich A.M., Pozdyshev D.V., Muronetz V.I., Andreev Y.A. Modulation of TRPV1 and TRPA1 channels function by sea anemones' peptides enhances the viability of SH-SY5Y cell model of Parkinson's disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2024;25(1):368. DOI: 10.3390/ijms25010368
 9. Kozlov S.A., Andreev Ia.A., Murashev A.N., Skobtsov D.I., D'iachenko I.A., Grishin E.V. New polypeptide components from the *Heteractis crispata* sea anemone with analgesic activity. *Bioorganic Chemistry*. 2009;35(6):711–719. DOI: 10.1134/S1068162009060065
 10. Logashina Yu.A., Palikova Y.A., Palikov V.A., Kazakov V.A., Smolskaya S.V., Dyachenko I.A., Tarasova N.V., Andreev Y.A. Anti-inflammatory and analgesic effects of TRPV1 polypeptide modulator APHC3 in models of osteo- and rheumatoid arthritis. *Mar. Drugs*. 2021;19(1):39. DOI: 10.3390/md19010039
 11. Martins D., Tavares I., Morgado C. “Hotheaded”: The role of TRPV1 in brain functions. *Neuropharmacology*. 2014;85:151–157. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2014.05.034

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Павлов Владимир Михайлович*, Филиал ФГБУН ГНЦ РФ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пущинский филиал ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет»;
e-mail: v.m.pavlov29@gmail.com

Федотова Анастасия Юрьевна, Филиал ФГБУН ГНЦ РФ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пущинский филиал ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет»;
e-mail: anastasiafedotova18@gmail.com

Vladimir M. Pavlov*, Branch of the Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Pushchino Branch of the Russian Biotechnological University;
e-mail: v.m.pavlov29@gmail.com

Anastasia Yu. Fedotova, Branch of the Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Pushchino Branch of the Russian Biotechnological University;
e-mail: anastasiafedotova18@gmail.com

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

АНТИГИПЕРТЕНЗИВНЫЙ ЭФФЕКТ ТАКСИФОЛИНА НА МОДЕЛИ ВОЗРАСТНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ

Н.А. Перепеченова^{1,2,*}, Е.А. Туховская², А.М. Исмаилова², Э.Р. Шайхутдинова²,
Г.А. Слащева², Е.С. Садовникова², И.А. Дьяченко², А.Н. Мурашёв²

¹ Пушчинский филиал ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет»
142290, Российская Федерация, Московская обл., Пушкино, просп. Науки, 3

² Филиал ФГБУН ГНЦ РФ Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН
142290, Российская Федерация, Московская обл., Пушкино, просп. Науки, 6

В работе было показано, что с возрастом у крыс Wistar развивается возрастная артериальная гипертензия у 52% 18-месячных животных против 33% у 3-месячных животных. Было изучено влияние препарата Таксифолин в дозе 100 мг/кг, вводимого внутривентриально на протяжении недели, на величину артериального давления (АД) и параметров биохимии у 18-месячных животных и 3-месячных животных при разделении этих животных на нормотензивных (АД ниже 115 мм рт. ст.) и гипертензивных (АД выше 115 мм рт. ст.). Было показано, что недельный курс Таксифолина приводит к достоверному снижению АД у гипертензивных 18-месячных животных, при отсутствии влияния на АД у нормотензивных животных. Было показано также наличие возрастных изменений биохимических параметров крови и наличие влияния Таксифолина на некоторые биохимические параметры крови.

Ключевые слова: крысы Wistar, давление, Таксифолин

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Перепеченова Н.А., Туховская Е.А., Исмаилова А.М., Шайхутдинова Э.Р., Слащева Г.А., Садовникова Е.С., Дьяченко И.А., Мурашёв А.Н. Антигипертензивный эффект Таксифолина на модели возрастной гипертензии. *Биомедицина*. 2024;20(3E):206–210. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-206-210>

Поступила 15.04.2024

Принята после доработки 22.07.2024

Опубликована 01.11.2024

TAXIFOLIN ANTIHYPERTENSIVE EFFECT IN AN AGE-RELATED HYPERTENSION MODEL

Natalya A. Perepechenova^{1,2,*}, Elena A. Tukhovskaya², Alina M. Ismailova²,
Elvira R. Shayhutdinova², Gulsara A. Slashcheva², Elena S. Sadovnikova²,
Igor A. Dyachenko², Arkadiy N. Murashev²

¹ Pushchino Branch of the Russian Biotechnological University
142290, Russian Federation, Moscow Region, Pushchino, Nauki Ave., 3

² Branch of the Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry
of the Russian Academy of Sciences
142290, Russian Federation, Moscow Region, Pushchino, Nauki Ave., 6

This work shows that age-related arterial hypertension in Wistar rats develops with age, in 52% of 18-month-old animals versus 33% of 3-month-old animals. Effects of Taxifolin at a dose of 100 mg/kg, administered intraperitoneally for a week, on blood pressure (BP) and biochemical parameters in 18-month-old and 3-month-old animals were studied. The experimental animals were divided into two groups, those normotensive (BP<115 mmHg) and hypertensive (BP>115 mmHg). It was shown that a weekly course of Taxifolin leads to a significant decrease in blood pressure in hypertensive 18-month-old animals with no effect on blood pressure in normotensive animals. In addition, some age-related changes in the biochemical parameters of blood under the influence of Taxifolin were revealed.

Keywords: Wistar rats, blood pressure, Taxifolin

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

For citation: Perepechenova N.A., Tukhovskaya E.A., Ismailova A.M., Shayhutdinova E.R., Slashcheva G.A., Sadovnikova E.S., Dyachenko I.A., Murashev A.N. Taxifolin Antihypertensive Effect in an Age-Related Hypertension Model. *Journal Biomed.* 2024;20(3E):206–210. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-206-210>

Submitted 15.04.2024

Revised 22.07.2024

Published 01.11.2024

Введение

Артериальная гипертензия (АГ) — синдром, являющийся одним из ведущих причин смертности во всём мире. По оценкам Всемирной организации здравоохранения на 2023 г., АГ страдают не менее 1,28 млрд взрослых. АГ может развиваться с возрастом без наследственной предрасположенности и других причин, хотя это и считается факторами риска, и часто проявляется вместе с другими возрастными заболеваниями [1]. Следовательно, возникает необходимость в лекарствах и биологически активных добавках (БАД), способных точно влиять на физиологические параметры и обладающих минимумом побочных эффектов. Одним из таких БАД является Таксифолин, для которого было показано положительное влияние при повышении давления [6, 7]. Мы решили проверить влияние БАД Таксифолин на модели возрастной гипертензии на давление и биохимические параметры.

Материалы и методы

Работа проведена на базе лаборатории биологических испытаний ФИБХ РАН (Московская обл., Пущино).

Традиционно антигипертензивные вещества изучаются на модели с использованием крыс линий SHR (Spontaneously Hypertensive Rats) и WKY (Wistar-Kyoto), однако в случае возрастной гипертензии, не обусловленной генетически, эта модель не подходит [3]. Проверка влияния Таксифолина на возрастные изменения физиологических параметров самцов крыс была выполнена на животных SPF популяции линий Wistar в возрастных группах 3 и 18 мес. У всех животных было измерено артериальное давление (АД) неинвазивным методом при помощи хвостовой манжеты. Использовали компьютеризированную систему PowerLab ML125 и единицу для неинвазивного измерения артериального давления NIBP System («ADInstruments», Австралия). После животные обеих возрастов были поделены по значению систолического давления на нормотензивных (АД до 115 мм рт. ст.) и гипертензивных (АД выше 115 мм рт. ст.) [7]. После каждая группа была ещё раз поделена пополам. Половина животных получала препарат Таксифолин в дозе 100 мг/кг внутривентрально, вторую половину составили контрольные животные с нормальным и повы-

шенным давлением, которые получали физ. р-р. После 7 дней введения у животных снова измерили АД, и они были эвтаназированы с забором крови на получение сыворотки. Сыворотку получали центрифугированием на центрифуге Eppendorf на 1600 g в течение 15 мин при температуре +4°C, после чего замораживали на -20°C до измерения. Измерение биохимических параметров проводилось на приборе Saphire 400 Tokio Boeki с использованием реагентов фирмы «Randox» (Великобритания).

Результаты и их обсуждение

Доля гипертензивных животных в группе крыс в возрасте 3 мес. составляла 33%, а у крыс в возрасте 18 мес. уже 52% животных были с гипертензией.

У животных с гипертензией в возрасте 18 мес. было показано достоверно значимое снижение АД после недельного курса Таксифолина, у животных с повышенным АД в возрасте 3 мес. — тенденция к снижению АД. Сравнение показателей АД у нормотензивных животных контрольной группы и получавших Таксифолин, обоих возрастов, не показали достоверных отличий.

Анализ биохимических параметров сыворотки показал значимые отличия при попарном сравнении аналогичных групп (нормотензивные/нормотензивные, гипертензивные/гипертензивные) разных возрастов. Во всех четырёх парах сравнения наблюдалась одинаковая картина: повышение холестерина и триглицеридов, повышение креатинина, снижение уровней мочевины и щелочной фосфатазы (ЩФ). Повышение холестерина и триглицеридов как факторов нарушения липидного обмена считается характерным возрастным признаком [4]. Наблюдалось повышение креатинина, как одного из показателей работы почек,

и снижение уровней мочевины и ЩФ, однако не было замечено значимых изменений аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспаратаминотрансферазы (АСТ) как показателей работы печени (эти показатели требуют последующего изучения другими методами, т. к. невозможно однозначно отнести полученные данные к дисфункции определённого органа или системы) [2, 5].

Сравнение биохимических показателей между группами животных, получавших Таксифолин, и контрольными животными в соответствии с возрастом и показателями давления выявило несколько отличий. У нормотензивных животных, получавших Таксифолин, по сравнению с контрольными животными обоих возрастов было показано снижение уровня ЩФ, которое невозможно однозначно отнести к определённому типу нарушений. У гипертензивных животных в возрасте 3 мес. было обнаружено снижение уровня глюкозы и повышение билирубина. У гипертензивных животных в возрасте 18 мес., получавших Таксифолин, по сравнению с контрольными животными был обнаружен повышенный уровень креатинина, что может указывать на нарушение работы почек [2, 5], однако повышение уровней мочевины и ЩФ, учитывая возрастное снижение этих параметров, следует считать терапевтическим эффектом и тенденцией к нормализации показателей.

Выводы

Результаты исследования подтвердили антигипертензивный эффект Таксифолина на модели возрастной гипертензии (на 18-месячных животных). Также были показаны изменения некоторых биохимических показателей, особенно мочевины и ЩФ, которые требуют дальнейшего, более подробного изучения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Информационный бюллетень ВОЗ о гипертензии. Всемирная Организация Здравоохранения. Пер. с англ. 2023. [*Informatsionnyy byulleten' VOZ o gipertonii* [Informational WHO bulletin about hypertension]. World Health Organization. Transl. from English. 2023. (In Russian)].
2. Кишкун А.А. Руководство по лабораторным методам диагностики, 2-е изд. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. [Kishkun A.A. *Rukovodstvo po laboratornym metodam diagnostiki*, 2-e izd. [Handbook of laboratory methods of diagnostics, 2th ed.]. Moscow: GEOTAR-Media Publ., 2014. (In Russian)].
3. Слащева Г.А., Рыков В.А., Лобанов А.В. Мурашев А.Н., Ким Ю.А., Арутюнян Т.В., Корыстова А.Ф., Кублик Л.Н., Левитман М.Х., Шапошникова В.В., Корыстов Ю.Н. Дигидрокверцетин не влияет на увеличение артериального давления и активности ангиотензинпревращающего фермента в аорте гипертензивных крыс с возрастом. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2016;5(161):610–614. [Slasheva G.A., Rykov V.A., Lobanov A.V., Murashev A.N., Kim Yu.A., Arutyunyan T.V., Korystova A.F., Kublik L.N., Levitman M.Kh., Shaposhnikova V.V., Korystov Yu.N. Digidrokvvertsetin ne vliyaet na uvelichenie arterial'nogo davleniya i aktivnosti angiotenzinprevrashchayushchego fermenta v aorte gipertenzivnykh kryс s vozrastom [Dihydroqercetin does not effect on increasing arterial blood pressure and angiotensintransforming ferment activity in hypertensive rats' aorta with aging]]. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny* [Bulletin of Experimental Biology and Medicine]. 2016;5(161):610–614. (In Russian)].
4. Тукин В.Н., Федорова М.З. Возрастные изменения биохимических показателей и их взаимосвязь с жёсткостью мембран гемцитов у здоровых мужчин и женщин. *Научные ведомости*. 2012;3(122):155–160. [Tukin V.N., Fedorova M.Z. Vozrastnye izmeneniya biokhimicheskikh pokazateley i ikh vzaimosvyaz' s zhestkost'yu membran gemotsitov u zdorovykh muzhchin i zhenshchin [Age-dependent changes of biochemistry parameters and their connection with gemocyte membranes' tension of healthy men and women)]. *Nauchnye vedomosti* [Scientific News]. 2012;3(122):155–160. (In Russian)].
5. Хиггинс К. Рациифровка клинических лабораторных анализов, 7-е изд. (эл.). Пер. с англ.; под ред. проф. В.Л. Эмануэля. М.: Лаборатория знаний, 2016. [Higgins Ch. *Rasshifrovka klinicheskikh laboratornykh analizov*, 7-e izd. (el.) [Understanding laboratory investigations, 3th ed.]. Transl. from English; ed. by prof. V.L. Emmanuel. Moscow: Laboratoriia Znanii Publ., 2016. (In Russian)].
6. Шакула А.В., Некрасов В.И., Щегольков А.М., Клишко В.В., Ярошенко В.П., Дергачева Л.И. Применение дигидрокверцетина в комплексном лечении гипертонической болезни. *Врач*. 2008;4:42–45. [Shakula A.V., Nekrasov V.I., Shchegol'kov A.M., Klimko V.V., Yaroshenko V.P., Dergacheva L.I. Prime-nenie digidrokvvertsetina v kompleksnom lechenii gipertonicheskoy bolezni [Dihydroqercetin use for complex therapy of hypertension disease]. *Vrach* [The Doctor]. 2008;4:42–45. (In Russian)].
7. Tukhovskaya E.A., Slasheva G.A., Shaykhutdinova E.R., Ismailova A.M., Palikova Y.A., Palikov V.A., Rasskazova E.A., Semushina S.G., Perepechenova N.A., Sadovnikova E.S., Kravchenko I.N., Dyachenko I.A., Murashev A.N. Taxifolin reduces blood pressure in elderly hypertensive male Wistar rats. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2022;174(1):29–32. DOI: 10.1007/s10517-022-05642-9

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Перепеченова Наталья Александровна*,
Пущинский филиал ФГБОУ ВО «Российский
биотехнологический университет», Филиал
ФГБУН ГНЦ РФ Институт биоорганической
химии им. академиков М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова РАН;
e-mail: natka_1511@mail.ru

Туховская Елена Александровна, к.фарм.н.,
Филиал ФГБУН ГНЦ РФ Институт биоорганической
химии им. академиков М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова РАН;
e-mail: elentuk@mail.ru

Natalya A. Perepechenova*, Pushchino Branch
of the Russian Biotechnological University, Branch
of the Shemyakin and Ovchinnikov Institute
of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy
of Sciences;
e-mail: natka_1511@mail.ru

Elena A. Tukhovskaya, Cand. Sci. (Pharm.),
Branch of the Shemyakin and Ovchinnikov Institute
of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy
of Sciences;
e-mail: elentuk@mail.ru

Исмаилова Алина Магомедовна, Филиал
ФГБУН ГНЦ РФ Институт биоорганиче-
ской химии им. академиков М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова РАН;
e-mail: ismailowa.a.m@yandex.ru

Alina M. Ismailova, Branch of the Shemyakin
and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry
of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: ismailowa.a.m@yandex.ru

Шайхутдинова Эльвира Рауильевна, к.б.н.,
Филиал ФГБУН ГНЦ РФ Институт биооргани-
ческой химии им. академиков М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова РАН;
e-mail: shaykhutdinova@bibch.ru

Elvira R. Shayhutdinova, Cand. Sci. (Biol.),
Branch of the Shemyakin and Ovchinnikov Institute
of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy
of Sciences;
e-mail: shaykhutdinova@bibch.ru

Слащева Гульсара Амангалиевна, к.б.н.,
Филиал ФГБУН ГНЦ РФ Институт биооргани-
ческой химии им. академиков М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова РАН;
e-mail: slashcheva_ga@mail.ru

Gulsara A. Slashcheva, Cand. Sci. (Biol.), Branch
of the Shemyakin and Ovchinnikov Institute
of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy
of Sciences;
e-mail: slashcheva_ga@mail.ru

Садовникова Елена Станиславовна, Филиал
ФГБУН ГНЦ РФ Институт биоорганиче-
ской химии им. академиков М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова РАН;
e-mail: elenasadovnikova@yandex.ru

Elena S. Sadovnikova, Branch of the Shemyakin
and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry
of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: elenasadovnikova@yandex.ru

Дьяченко Игорь Александрович, д.б.н., доц.,
Филиал ФГБУН ГНЦ РФ Институт биооргани-
ческой химии им. академиков М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова РАН;
e-mail: dyachenko@bibch.ru

Igor A. Dyachenko, Dr. Sci. (Biol.), Assoc. Prof.,
Branch of the Shemyakin and Ovchinnikov Institute
of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy
of Sciences;
e-mail: dyachenko@bibch.ru

Мурашёв Аркадий Николаевич, д.б.н., проф.,
Филиал ФГБУН ГНЦ РФ Институт биооргани-
ческой химии им. академиков М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова РАН;
e-mail: murashev@bibch.ru

Arkadiy N. Murashev, Dr. Sci. (Biol.), Prof.,
Branch of the Shemyakin and Ovchinnikov Institute
of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy
of Sciences;
e-mail: murashev@bibch.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

ОЦЕНКА РАНОЗАЖИВЛЯЮЩЕГО ЭФФЕКТА ГИДРОГЕЛЕЙ НА МОДЕЛИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОЖОГА У ГРЫЗУНОВ

Е.Д. Семивеличенко^{1,*}, А.С. Романовский¹, А.В. Еремин²,
С.М. Напалкова¹, О.В. Буюклинская¹

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

197376, Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 14, лит. А

² Филиал ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова
Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» —
Институт высокомолекулярных соединений

199004, Российская Федерация, Санкт-Петербург, Васильевский остров, Большой пр., 31

В статье представлены результаты исследования эффективности гидрогелей, содержащих комплексы кальция и/или иономеры на основе комплексов меди (II), на скорость заживления раневой поверхности, образованной в результате термического ожога.

Ключевые слова: крысы, заживление ран, поливинилпирролидон, полиэтиленгликоль, медь, кальций

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Семивеличенко Е.Д., Романовский А.С., Еремин А.В., Напалкова С.М., Буюклинская О.В. Оценка ранозаживляющего эффекта гидрогелей на модели экспериментального ожога у грызунов. *Биомедицина*. 2024;20(3E):211–215. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-211-215>

Поступила 15.04.2024

Принята после доработки 05.08.2024

Опубликована 01.11.2024

ASSESSMENT OF THE WOUND-HEALING EFFECT OF HYDROGELS ON AN EXPERIMENTAL BURN MODEL IN RODENTS

Evgeniy D. Semivelichenko^{1,*}, Anton S. Romanovsky¹, Aleksey V. Eremin²,
Svetlana M. Napalkova¹, Olga V. Buyuklinskaya¹

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

² Branch of Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of National Research Center
“Kurchatov Institute” — Institute of Macromolecular Compounds
199004, Russian Federation, Saint Petersburg, Vasilievsky Island, Bolshoy Ave., 31

The article presents the results of a research study into the effectiveness of hydrogels containing calcium complexes and/or ionomers based on copper (II) complexes on the healing rate of a wound surface formed by a thermal burn.

Keywords: rats, wound healing, polyvinylpyrrolidone, polyethylene glycol, copper, calcium

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

For citation: Semivelichenko E.D., Romanovsky A.S., Eremin A.V., Napalkova S.M., Buyuklinskaya O.V. Assessment of the Wound-Healing Effect of Hydrogels on an Experimental Burn Model in Rodents. *Journal Biomed*. 2024;20(3E):211–215. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-211-215>

Submitted 15.04.2024

Revised 05.08.2024

Published 01.11.2024

Введение

Термический ожог — это поражение кожи с полным или частичным разрушением клеток кожи и/или нижележащих тканей [2]. По данным ВОЗ, ежегодно 11 млн чел. страдают от ожоговых ран, и 180 000 случаев заканчиваются летальным исходом [5]. В Российской Федерации в 2022 г. за медицинской помощью с термическими ожогами обратились 203 000 чел., из них умерло 6120. Ожоговый травматизм составляет 1,6% от всех травм, вызванных внешним воздействием [1]. Несмотря на развитие регенеративной терапии и комбустиологии, лечение ожоговых больных до сих пор является сложной задачей, т. к. не разработаны и не внедрены идеальные наружные средства лечения ожоговых ран, к тому же в 94% случаев в ране обнаруживаются бактерии. На данный момент препаратами, ускоряющими регенерацию тканей при ожоге, являются декспантенол, метилурацил, облепиховое масло, препараты ультрафильтратов телячьей крови [2]. Однако они имеют ряд недостатков, которые ограничивают их использование. В совокупности эти факторы определяют время госпитализации пациента. Так, в России средняя длительность пребывания на койке составляет 17,9 дня, а занятость койки составляет 262,7 дня. Это в свою очередь определяет финансовую стоимость ведения одного больного [1]. Именно поэтому актуальны разработка и поиск новых субстанций, обладающих высоким ранозаживляющим эффектом.

Гидрогели представляют собой сшитые полимерные цепи с трёхмерной (3D) сетчатой структурой, которые могут поглощать относительно большие количества жидкости. Преимущества гидрогелей: возможность регулировать биоразлагаемость и биосовместимость путём модификации функциональных групп, обес-

печивают увлажнение раны, образуют защитный барьер на поверхности раны, обеспечивают газообмен, ускоряют заживление, имеется возможность введения в состав различных активных фармацевтических субстанций [4].

Целью данного исследования являлась оценка ранозаживляющего эффекта гидрогелей, содержащих комплексы кальция и/или иономеры на основе комплексов меди (II), в сравнении с препаратом Депантол® на модели термического ожога у лабораторных крыс.

Материалы и методы

Синтез гидрогелей был произведён в Институте высокомолекулярных соединений. Основу экспериментальных препаратов — гидрогель — готовили смешением р-ра PVP ($M_w \sim 106$), PEG-400, ацетата натрия, этанола, глицерина, триэтаноламина и воды с последующей УФ-обработкой (Hg-лампа высокого давления, 250 Вт, 20 мин). Р-р комплекса кальция $[Ca(TEG)_2](OAc)_2$ был приготовлен взаимодействием триэтиленгликоля (TEG) и р-ра $Ca(OAc)_2$. Иономерные комплексы $[Cu^{II}(L)_n](polymer)$, (L — триэтилентетрамин (TETA) или N,N,N',N' -тетраметилэтилендиамин (TMEDA); polymer — частично гидролизованный поливинилпирролидон (HPVP) или сополимер винилпирролидон-котоновая кислота (VPKK)) были приготовлены растворением свежесосаждённого $Cu(OH)_2$ в р-ре полимерной карбоновой кислоты (HPVP или VPKK) с последующим добавлением аминатного лиганда L (TETA или TMEDA). Во всех экспериментальных р-рах концентрация $[Ca^{2+}]$ составляла 120 μM , концентрация $[Cu^{2+}]$ — 120 μM (группы 1–6), 240 μM (группа 7) и 360 μM (группа 8).

Исследование проводилось на аутбредных крысах-самцах (n=50), которые были рандомизированы в 10 групп по 5 особей: группы S1–S8 — исследуемые гидрогели; группа 9 — препарат сравнения Депантол®; группа 10 — патология без лечения (негативный контроль). Для моделирования ожога (III степень) в крестцовой и хвостовой областях у крыс выбривалась шерсть для доступа к коже, проводилась наркотизация (смесь Золетил-Ксилазин), затем металлическим круглым зондом наносилось повреждение кожного покрова (термостатирование 350°C, экспозиция 1 мин, D_{зонда} =25 мм). Поражённый участок ежедневно оценивался и измерялся с фотофиксацией. Препараты наносили 28 дней по 0,2 мл.

Результаты исследований

После моделирования образовалась раневая поверхность с плотным, неравномерным по толщине струпом. В ходе эксперимента оценивалась динамика заживления раневой поверхности, а также смертность в каждой группе. Динамика заживления оценивалась по размеру площади раневой

поверхности и индексу заживления. Была посчитана медиана площади раневой поверхности в каждой группе за каждые 7 сут эксперимента, также рассчитан индекс заживления по следующей формуле [3]:

$$\frac{(S - S_n) \times 100}{(S \times T)},$$

где S — площадь раны при предыдущем измерении, мм²; S_n — площадь раны при данном измерении, мм²; T — интервал между измерениями, сут.

Обработка данных и построение графиков проводилось в программе GraphPad Prism 9 («GraphPad Software», США). Для оценки различий применялся двухфакторный дисперсионный анализ. Различия считались достоверными при p<0,05.

В ходе анализа ранозаживляющего эффекта гидрогелей и эталонного препарата были получены данные, представленные в таблице.

В ходе эксперимента были получены следующие результаты: гидрогели 1, 2 и 5 показали высокую эффективность в сравнении с препаратом Депантол®, а также в сравнении с гидрогелями 6 и 7. Гидрогель 3 показал более низкую эффективность, чем

Таблица. Динамика заживления

Table. Healing dynamics

Группа	День				
	1-й	7-й	14-й	21-й	28-й
S1 гидрогель (основа)	21,07±1,79	22,07±1,55	19,91±0,8	11,97±4,42	7,49±3,34
S2 (основа + [Cu(ТЭТА)](HPVP))	23,22±2,95	23,07±2,75	20,12±1,7	15,16±3,25	7,51±2,88
S3 (основа + [Ca(ТЭГ) ₂](OAc) ₂ + [Cu(ТЭТА)](HPVP))	24,06±3,36	22,49±1,76	18,92±1,42	13,79±4,05	9,38±6,54
S5 основа + [Cu(Tmeda)](VPKK)	22,77±3,57	22,85±0,88	18,07±2,28	11,72±2,7	5,34±1,35
S6 (основа + [Ca(ТЭГ) ₂](OAc) ₂ + 1 экв. [Cu(Tmeda)](VPKK))	21,24±0,87	20,83±1,42	19,32±1,13	15,52±2,93	11,43±1,52
S7 (основа + [Ca(ТЭГ) ₂](OAc) ₂ + 2 экв. [Cu(Tmeda)](VPKK))	24,12±2,06	22,98±1,12	22,57±3,10	16,26±2,31	9,39±4,11
9 Препарат сравнения – Депантол®	23,53±0,92	23,39±2,24	19,39±2,64	14,56±6,75	10,29±5,88
10 Контрольная группа (Негативный контроль)	24,36±2,12	30,65±1,74	29,47±1,59	23,02±1,57	17,91±2,13

Примечание: данные представлены в виде M±m, где M — среднее арифметическое значение показателя группы, m — среднее квадратическое отклонение.

Note: data are presented as M±m, where M — arithmetic mean of the group index, m — standard deviation.

1 и 5, но более высокую, чем препарат сравнения и гидрогели 6 и 7.

Заключение

В группах животных, получавших препарат чистого гидрогеля (S1) и гидрогель, содержащий иономерный комплекс $[Cu^{II}(TMEDA)](VPKK)$ (S5), результат превосходил Депантол® по индексу заживления в 3 раза, по площади остаточного раневого процесса — в 3 и 6 раз (40,12 мм² (S1), 23,54 мм² (S5) и 134 мм² (S9, препарат сравнения, соответственно). В группах S6 и S7 показан умеренный эффект или схожий с препаратом сравнения. Препарат на основе гидрогеля и комплекса

$[Ca(TЭГ)_2](OAc)_2$ (S4, $[Ca^{2+}] \sim 120 \mu M$) вызвал гибель экспериментальных животных, хотя в большинстве внеклеточных жидкостей $[Ca^{2+}]$ составляет около 1 mM, а его внутриклеточная концентрация — порядка 0,1 μM , за счёт совместного действия насосов и переносчиков, выводящих ионы Ca^{2+} , или концентрирующих их в эндоплазматическом ретикулуме или митохондриях клеток. Вероятной причиной наблюдаемого эффекта является лёгкое проникновение комплекса кальция через клеточную мембрану, обусловленное составом комплекса $[Ca(TЭГ)_2](OAc)_2$, однако данное предположение требует дополнительных исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Александрова Г.А., Ахметзянова Р.Р., Голубев Н.А., Кириллова Г.Н., Огрызко Е.В., Оськов Ю.И., Романенко О.И., Харьков Т.Л., Чумарина В.Ж. Здравоохранение в России 2023. *Статистический сборник Росстат*. 2023;53–56. [Alexandrova G.A., Akhmetzyanova R.R., Golubev N.A., Kirillova G.N., Ogryzko E.V., Eskov Yu.I., Romanenko O.I., Kharkova T.L., Chumarina V.Zh. Zdravookhranenie v Rossii 2023 [Healthcare in Russia 2023]. *Statisticheskiiy sbornik Rosstat* [Statistical Collection of Rosstat]. 2023;53–56. (In Russian)].
2. Семивеличенко Е.Д., Ермолаева А.А., Пономаренко В.В., Новоселов А.В., Плиско Г.А., Ивкин Д.Ю., Антонов В.Г., Карев В.Е., Титович И.А., Ерёмин А.В. Исследование эффективности действия препаратов на основе молекулярных комплексов аденозин-полимер на модели термического ожога. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(3):209–219. [Semivelichenko E.D., Ermolaeva A.A., Ponomarenko V.V., Novoselov A.V., Plisko G.A., Ivkin D.Yu., Antonov V.G., Karev V.E., Titovich I.A., Eremin A.V. Issledovanie effektivnosti deystviya preparatov na osnove molekulyarnykh kompleksov adenzin-polimer na modeli termicheskogo ozhoga [Study of the effectiveness of drugs based on molecular complexes of adenosine-polymer on the model of thermal burn]. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv* [Drug Development & Registration]. 2022;11(3):209–219. (In Russian)]. DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-3-209-219
3. Шабунин А.С., Зиновьев Е.В., Виссарионов С.В., Асадулаев М.С., Макаров А.Ю., Федюк А.М., Рыбинских Т.С., Першина П.А., Костяков Д.В., Семиглазов А.В., Пятакова С.Н. Оценка эффективности лечения ожогов 3 степени пептидом hldf6 и наночастицами серебра в геле carbopol 2020 в эксперименте *in vivo*. *Российские биомедицинские исследования*. 2023;8(3):4–10. [Shabunin A.S., Zinoviev E.V., Vissarionov S.V., Asadulaev M.S., Makarov A.Yu., Fedyuk A.M., Rybinskikh T.S., Pershina P.A., Kostyakov D.V., Semiglazov A.V., Pyatakova S.N. Otsenka effektivnosti lecheniya ozhogov 3 stepeni peptidom hldf6 i nanochastitsami srebra v gele carbopol 2020 v eksperimente *in vivo* [Evaluation of the efficacy of treatment of 3rd degree burns with hldf6 peptide and silver nanoparticles in carbopol 2020 gel *in vivo* experiment]. *Rossiyskie biomeditsinskie issledovaniya* [Russian Biomedical Research]. 2023;8(3):4–10. (In Russian)]. DOI: 10.56871/RBR.2023.37.44.001
4. Ho T.C., Chang C.C., Chan H.P., Chung T.W., Shu C.W., Chuang K.P., Duh T.H., Yang M.H., Tyan Y.C. Hydrogels: Properties and applications in biomedicine. *Molecules*. 2022;27(9):2902. DOI: 10.3390/molecules27092902
5. Markiewicz-Gospodarek A., Koziol M., Tobiasz M., Baj J., Radzikowska-Büchner E., Przekora A. Burn wound healing: Clinical complications, medical care, treatment, and dressing types: The current state of knowledge for clinical practice. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2022;19(3):1338. DOI: 10.3390/ijerph19031338

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Семивеличенко Евгений Дмитриевич*, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России;
e-mail: evgeniy.semivelichenko@pharminnotech.com

Evgeniy D. Semivelichenko*, Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: evgeniy.semivelichenko@pharminnotech.com

Романовский Антон Сергеевич, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России;
e-mail: anton.romanovskij@spcpcu.ru

Anton S. Romanovsky, Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: anton.romanovskij@spcpcu.ru

Ерёмин Алексей Владимирович, к.х.н., доц., Филиал ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» — Институт высокомолекулярных соединений;
e-mail: ha9room@gmail.com

Aleksey V. Eremin, Cand. Sci. (Chem.), Assoc. Prof., Branch of Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of National Research Center “Kurchatov Institute” — Institute of Macromolecular Compounds;
e-mail: ha9room@gmail.com

Напалкова Светлана Михайловна, д.б.н., проф., ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России;
e-mail: svetlana.napalkova@pharminnotech.com

Svetlana M. Napalkova, Dr. Sci. (Biol.), Prof., Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: svetlana.napalkova@pharminnotech.com

Буюклинская Ольга Владимировна, д.м.н., проф., ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России;
e-mail: olga.buyklinskaya@pharminnotech.com

Olga V. Buyuklinskaya, Dr. Sci. (Med.), Prof., Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: olga.buyklinskaya@pharminnotech.com

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author



ВЛИЯНИЕ КСИЛАЗИН-ЗОЛЕТИЛОВОЙ АНЕСТЕЗИИ НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ МЫШЕЙ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ИЗЛУЧЕНИЙ С РАЗНЫМИ ЗНАЧЕНИЯМИ ЛИНЕЙНОЙ ПОТЕРИ ЭНЕРГИИ

Н.С. Стрельникова^{1,*}, О.М. Розанова², Е.Н. Смирнова²,
Т.А. Белякова^{2,3}, Е.А. Кузнецова²

¹ Филиал «Физико-технический центр» ФГБУН Физический институт им. П.Н. Лебедева РАН
142281, Российская Федерация, Московская обл., Протвино, ул. Мира, 1Н

² ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН
142290, Российская Федерация, Московская обл., Пущино, ул. Институтская, 3

³ ФГБУ «Институт физики высоких энергий им. А.А. Логонова Национального исследовательского
центра «Курчатовский институт»
142281, Российская Федерация, Московская обл., Протвино, пл. Науки, 1

Определена выживаемость мышей через 30 дней после воздействия протонов, ионов углерода или рентгеновского излучения в присутствии и отсутствии ксилазин-золетиловой анестезии. Показано, что использованная анестезия способствует увеличению продолжительности жизни мышей в указанный период для фотонов и большинства применённых доз протонов и углерода. Максимальное влияние анестезии наблюдали при облучении ионами углерода (в 3,3 раза), протонами (в 1,7 раза), при рентгеновском излучении (в 1,7–2 раза), что следует учитывать при выборе доз и свидетельствует о специфике сочетанного действия анестезии и физических характеристик излучений.

Ключевые слова: протоны, ионы углерода, рентгеновское излучение, ксилазин-золетиловая анестезия, выживаемость, мыши

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: работа выполнена в рамках государственного задания ИТЭБ РАН № 075-01027-23-01 при частичном финансировании из средств договора НИР № 28/22 между ФТЦ ФИАН и ИТЭБ РАН.

Для цитирования: Стрельникова Н.С., Розанова О.М., Смирнова Е.Н., Белякова Т.А., Кузнецова Е.А. Влияние ксилазин-золетиловой анестезии на выживаемость мышей при воздействии излучений с разными значениями линейной потери энергии. *Биомедицина*. 2024;20(3E):216–220. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-216-220>

Поступила 05.04.2024

Принята после доработки 20.05.2024

Опубликована 01.11.2024

EFFECT OF XYLAZINE/ZOLETIL ANESTHESIA ON THE SURVIVAL OF MICE AFTER EXPOSURE TO RADIATIONS WITH DIFFERENT VALUES OF LINEAR ENERGY TRANSFER

Nataliia S. Strelnikova^{1,*}, Olga M. Rozanova², Helena N. Smirnova²,
Tatiana A. Belyakova^{2,3}, Elena A. Kuznetsova²

¹ Branch "Physical Technical Center", P.N. Lebedev Physical Institute of the Russian Academy of Sciences
142281, Russian Federation, Moscow Region, Protvino, Mira Str., 1H

² Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of the Russian Academy of Sciences
142290, Russian Federation, Moscow Region, Pushchino, Institutskaya Str., 3

³ Institute for High Energy Physics named after A.A. Logunov
of the National Research Centre "Kurchatov Institute"
142281, Russian Federation, Moscow Region, Protvino, Science Sq., 1

The survival of mice was determined 30 days after exposure to protons, carbon ions, or X-rays in the presence and absence of xylazine-zoletil anesthesia. The anesthesia used was shown to increase the lifespan of mice during the specified period for photons and most applied doses of protons and carbon. The maximum effect of anesthesia was observed when irradiated with carbon ions (by 3.3 times), with protons (by 1.7 times), and with X-ray radiation (by 1.7–2 times), which should be taken into account when selecting doses. This indicates the specificity of the combined effect of anesthesia and the physical characteristics of radiation.

Keywords: protons, carbon ion, X-rays, xylazine-zoletil anesthesia, survival, mice

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

Funding: the work was carried out as part the state assignment No. 075-013027-23-01 and under partial financial support from the funds of the agreement between the PTC LPI RAS and ITEB RAS No. 28/22.

For citation: Strelnikova N.S., Rozanova O.M., Smirnova H.N., Belyakova T.A., Kuznetsova E.A. Effect of Xylazine/Zoletil Anesthesia on the Survival of Mice after Exposure to Radiations with Different Values of Linear Energy Transfer. *Journal Biomed.* 2024;20(3E):216–220. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-216-220>

Submitted 05.04.2024

Revised 20.05.2024

Published 01.11.2024

Введение

При терапии рака ускоренными заряженными частицами, требующей высокоточного контроля позиционирования пациентов, особенно детей и пожилых, часто используется анестезия. Разные виды анестезии оказывают существенное действие на многие физиологические параметры, что влияет на результат лечения и радиочувствительность организма [1]. Основная часть исследований влияния анестезии на радиочувствительность проведена с использованием фотонных излучений с низкими значениями линейной потери энергии (ЛПЭ). Поскольку в последнее время всё больше внимания уделяется более эффективной адронной терапии, характеризующейся большими значениями ЛПЭ [3, 4], то для решения практических задач необходимо исследование радиочувствительности

объектов в сочетании с анестезирующими и седативными препаратами в зависимости от доз и качества применяемого излучения.

Целью работы являлось изучение влияния ксилазин-золетиловой анестезии на 30-суточную выживаемость мышей при тотальном облучении протонами, ионами углерода и рентгеновским излучением.

Материалы и методы

Эксперименты проводили на 2-месячных самцах мышей колонии SHK массой тела 30–35 г, которых содержали в стандартных условиях вивария. План экспериментов был одобрен Комиссией ИТЭБ РАН по биобезопасности и биоэтике. Всего было использовано 150 мышей.

Мышей облучали индивидуально в хорошо вентилируемых контейнерах. За 10 мин

до облучения мышам вводили внутривенно комбинацию препаратов ксилазина («Interchemie», Нидерланды) — 0,7 мг/кг и золетила 100 («Virbac», Франция) — 3,4 мг/кг. Препараты и дозы были подобраны на основе литературных данных о составе и механизмах действия соединений, а также биомедицинских результатов, полученных на мышах [2, 5]. Выбранная схема анестезии обеспечивала обездвиживание мышей во время укладки и облучения, 100% выход мышей из наркоза без введения дополнительных антагонистических препаратов и отсутствие гибели животных. Облучение животных пучком протонов с энергией около 100 МэВ в дозах 6,5–8,5 Гр в пике Брэгга (ЛПЭ=2,5±0,7 кэВ/мкм) проводили в ЦКП «Прометеус» ФТЦ ФИАН (Московская обл., Протвино). Облучение мышей моноэнергетическим пучком ионов углерода с энергией 450 МэВ/нуклон в дозе 6,5 Гр в пике Брэгга (ЛПЭ=39 кэВ/мкм) осуществляли на «Радиобиологическом стенде на углеродном пучке У-70» НИЦ «Курчатовский институт» — ИФВЭ (Московская обл., Протвино). Рентгеновским излучением (РИ) мышей облучали в диапазоне доз 6,0–8,5 Гр на установке РУТ (ЛПЭ=2 кэВ/мкм) в ЦКП «Источники излучения» (ИБК, Московская обл., Пущино).

Влияние анестезии оценивали по динамике гибели и средней продолжительности жизни (СПЖ) погибших мышей в течение 30 сут. Показатели сравнивали с помощью непараметрических критериев: Гехана — Вилкоксона — для оценки продолжительности жизни животных, логрангового критерия — для сравнения 30-суточной выживаемости. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Как видно из результатов, представленных в таблице, облучение мышей РИ в присутствии анестезии приводило к повышению 30-суточной выживаемости при всех

дозах. СПЖ мышей, облучённых в дозе 6,0 Гр с анестезией, составила 20 ± 5 сут, а без анестезии — 13 ± 3 сут, но после облучения в дозах 6,5 и 8,5 Гр не зависела от наличия анестезии и в среднем равнялась 13 ± 5 и 6 ± 3 сут соответственно.

При облучении протонами в дозах 6,5 и 7,5 Гр анестезия не влияла на динамику гибели, характер течения лучевой болезни и СПЖ мышей, но при облучении в дозе 8,5 Гр наблюдалось значительное повышение выживаемости: к 30-м сут выжило 45% животных по сравнению с неанестезированными мышами, где этот показатель был всего 5%. Для РИ и протонов был рассчитан фактор изменения дозы (ФИД) как отношение полуметальных доз при введении модифицирующего вещества и без него. Для определения ЛД_{50/30} использовали пробит-анализ в качестве метода преобразования кривых смертности. Для РИ ФИД=1,13, что свидетельствует о слабом защитном эффекте анестезии при этих дозах для фотонного излучения, а для протонов в пике Брэгга ФИД=0,94, т. е. не выявлено влияния анестезии на радиочувствительность мышей по этому показателю.

При облучении ионами углерода в дозе 6,5 Гр выявлено защитное влияние анестезии на 30-суточную выживаемость мышей: без анестезии к 7-м сут. наблюдалась 100% гибель, а при использовании анестезии 28% животных доживало до 30-х сут. СПЖ мышей не зависела от использования анестезии.

Влияние анестезии на радиационное поражение оценивали также по значениям площади под кривыми, отражающими динамику гибели мышей в течение 30 сут. Максимальный защитный эффект анестезии (в 3,3 раза) проявлялся при облучении мышей ионами углерода в дозе 6,5 Гр; при облучении протонами в дозах 6,5 и 7,5 Гр влияние анестезии на радиочувствительность мышей незначительно, но при облучении самой высокой дозой

Таблица. Влияние ксилазин-золетиловой анестезии на выживаемость мышей в течение 30 сут. после облучения
Table. Effect of xylazine-zoletil anesthesia on the survival rate of mice for 30 days after irradiation

Вид облучения, доза	Количество выживших мышей, %											
	5 сут		10 сут		15 сут		20 сут		25 сут		30 сут	
	+	–	+	–	+	–	+	–	+	–	+	–
РИ 6,0 Гр	100	100	100	88	90	38*	80	18*	70	18*	60	18*
РИ 6,5 Гр	100	95	100	80	60	15*	60	12*	50	5*	40	2*
РИ 8,5 Гр	89	70	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0
П 6,5 Гр	100	100	90	100	85	90	85	80	80	70	40*	70
П 7,5 Гр	100	100	90	90	55	50	55	50	45	50	45	40
П 8,5 Гр	100	90	80	70	60	20*	60	15*	50	5	45	5*
¹² C 6,5 Гр	95	20*	35	0*	30	0*	30	0*	28	0	28	0*

Примечания: «+» — с анестезией, «–» — без анестезии, РИ — рентгеновское излучение, П — протоны, ¹²C — ионы углерода. * — $p \leq 0,01$.

Notes: “+” — with anesthesia, “–” without anesthesia, РИ — X-rays, П — protons, ¹²C — carbon ions. * — $p \leq 0.01$.

8,5 Гр выживаемость возрастала в 1,7 раза. Значительное защитное действие анестезии по этому критерию показано и при действии РИ: в 1,7 раза — для доз 6,0 и 8,5 Гр и в 2 раза — для дозы 6,5 Гр.

Заключение

Таким образом, нами было показано, что применение ксилазин-золетиловой анестезии существенно снижает гибель животных при действии рентгеновского излучения и ионов углерода в дозах 6,0–6,5 Гр, а при облучении протонами такой эффект был выявлен только при дозе 8,5 Гр. Эти

факты указывают на многообразие сигнальных путей клеточного и тканевого взаимодействия в отдалённой реализации начальных повреждений при действии ускоренных частиц и фотонов в условиях *in vivo*. Полученные данные имеют практическое значение при внедрении новых методов радиотерапии в ветеринарии, разработке биомедицинских моделей для доклинических испытаний новых источников излучения, а также исследования механизмов сочетанного действия фармакологических веществ и радиации разного качества.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Гугушвили Б.С., Джанджгава И.М., Кахиани Э.Д., Надареишвили К.Ш., Санеблидзе О.Н., Хурция М.Н. *Радиопротекторы (справочник)*. Тбилиси: Мецниерева, 1987. [Gugushvili B.S., Dzhandzhgava I.M., Kakhiani E.D., Nadareishvili K.Sh., Sanebldize O.N., Khurtsiya M.N. *Radioprotektory (spravochnik)* [Radioprotectors (Handbook)]. Tbilisi: Metsniereva Publ., 1987. (In Russian).
2. Огнева Н.С., Савченко Е.С., Табоякова Л.А. Анестезия самок мышей при хирургической трансплантации эмбрионов. *Биомедицина*. 2021;17(3Е): 64–69. [Ogneva N.S., Savchenko E.S., Taboyakova L.A. Anesteziya samok myshyey pri khirurgicheskoy transplantatsii embriionov [Anesthesia of female mice during surgical embryo transfer]. *Biomeditsina* [Journal Biomed]. 2021;17(3E):64–69. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2713-0428-17-3E-64-69
3. Durante M., Debus J., Loeffler J.S. Physics and biomedical challenges of cancer therapy with accelerated heavy ions. *Nat. Rev. Phys.* 2021;3(12):777–790. DOI: 10.1038/s42254-021-00368-5
4. Vanderaerden L., Dok R., Verstrepen K., Nuyts S. Clinical progress in proton radiotherapy: Biological unknowns. *Cancers (Basel)*. 2021;13(4):604. DOI: 10.3390/cancers13040604
5. Zhang Y.M., Yu D.X., Yin B.S., Li X.R., Li L.N., Li Y.N., Wang Y.X., Chen Y., Liu W.H., Gao L. Xylazine regulates the release of glycine and aspartic acid in rat brain. *J. Vet. Res.* 2018;62(1):121–128. DOI: 10.1515/jvetres-2018-0017

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Стрельникова Наталья Сергеевна*, Филиал «Физико-технический центр» ФГБУН Физический институт им. П.Н. Лебедева РАН;
e-mail: strelnikova.ns@lebedev.ru

Nataliia S. Strelnikova*, Branch “Physical Technical Center”, P.N. Lebedev Physical Institute of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: strelnikova.ns@lebedev.ru

Розанова Ольга Митрофановна, ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН;
e-mail: rozanova.iteb@gmail.com

Olga M. Rozanova, Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: rozanova.iteb@gmail.com

Смирнова Елена Николаевна, ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН;
e-mail: smirnova.elena04@gmail.com

Helena N. Smirnova, Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: smirnova.elena04@gmail.com

Белякова Татьяна Анатольевна, ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, ФГБУ «Институт физики высоких энергий имени А.А. Логанова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»;
e-mail: belyakovatanya@mail.ru

Tatiana A. Belyakova, Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Institute for High Energy Physics named after A.A. Logunov of the National Research Centre “Kurchatov Institute”;
e-mail: belyakovatanya@mail.ru

Кузнецова Елена Ананьевна, к.б.н., ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН;
e-mail: kuzglu@rambler.ru

Elena A. Kuznetsova, Cand. Sci. (Biol.), Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: kuzglu@rambler.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

ВЛИЯНИЕ РЕСВЕРАТРОЛА НА РАЗВИТИЕ НЕАЛКОГОЛЬНОЙ ЖИРОВОЙ БОЛЕЗНИ ПЕЧЕНИ У КРЫС, ПОЛУЧАВШИХ ВЫСОКОЖИРОВОЙ ВЫСОКОФРУКТОЗНЫЙ РАЦИОН

Н.В. Трусов*, А.С. Балакина, К.В. Мжельская, Н.С. Никитин, И.В. Аксенов,
Г.В. Гусева, В.А. Тутельян

ФГБУН «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи»
109240, Российская Федерация, Москва, Устьинский пр-д, 2/14

Многие исследования указывают на способность полифенола ресвератрола (РЕС) оказывать благотворное влияние на заболевания печени, в т. ч. на неалкогольную жировую болезнь печени (НАЖБП). Липогенез *de novo* в печени рассматривается как один из возможных молекулярных механизмов развития ожирения и НАЖБП. Целью данной работы было изучение влияния РЕС на развитие НАЖБП и оценка экспрессии генов ключевых ферментов углеводного и липидного обмена у крыс, получавших рацион с высоким содержанием жира и фруктозы (ВЖВФР). В течение 10 недель контрольная группа крыс-самцов Wistar получала стандартный рацион и воду; три опытные группы — ВЖВФР. Крысы 2-й и 3-й опытных групп получали РЕС в суточной дозе 10 и 100 мг/кг массы тела соответственно. Проводили гистологическое исследование печени и изучали экспрессию генов ферментов углеводного (*Khk*, *Gck*, *Pklr*) и липидного (*Acaca*, *Fasn*, *Scd*) обмена, а также факторов транскрипции (*Mlxipl*, *Srebf1*, *Ppara*). Потребление ВЖВФР приводило к развитию НАЖБП, что сопровождалось увеличением экспрессии гена *Gck*, снижением — *Pklr*, *Acaca*, *Fasn*, *Scd*. РЕС в обеих дозах не оказал влияния на развитие НАЖБП, а также на экспрессию изучаемых генов.

Ключевые слова: неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП), ресвератрол, ферменты углеводного и липидного обмена, экспрессия генов

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: работа выполнена за счёт средств субсидии на выполнение государственного задания в рамках программы фундаментальных научных исследований (тема Минобрнауки РФ № 0529-2019-0058).

Для цитирования: Трусов Н.В., Балакина А.С., Мжельская К.В., Никитин Н.С., Аксенов И.В., Гусева Г.В., Тутельян В.А. Влияние ресвератрола на развитие неалкогольной жировой болезни печени у крыс, получавших высокожировую высокофруктозный рацион. *Биомедицина*. 2024;20(3E):221–228.
<https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-221-228>

Поступила 08.08.2024

Принята после доработки 26.08.2024

Опубликована 01.11.2024

EFFECT OF RESVERATROL ON THE DEVELOPMENT OF NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE IN RATS FED ON HIGH-FAT HIGH-FRUCTOSE DIET

Nikita V. Trusov*, Anastasia S. Balakina, Kristina V. Mzhelskaya, Nikolay S. Nikitin,
Ilya V. Aksenov, Galina V. Guseva, Victor A. Tutelyan

Federal Research Center for Nutrition, Biotechnology and Food Safety
109240, Russian Federation, Moscow, Ustinsky Passage, 2/14

The beneficial effect of polyphenol resveratrol (RES) on liver diseases, including non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), has been reported in numerous studies. *De novo* lipogenesis in the liver is considered as one of the possible molecular mechanisms for the development of obesity and NAFLD. This work aimed to study the effect of RES on the development of NAFLD and to evaluate the expression of carbohydrate and lipid metabolic key enzymes genes in rats fed on a high-fat high-fructose diet (HFHFrD). For 10 weeks, the control group of Wistar male rats received a standard diet and water; three experimental groups were fed on HFHFrD. The rats in the 2nd and 3rd experimental groups received RES at a daily dose of 10 and 100 mg/kg body weight, respectively. A histological examination of the liver was carried out and the expression of carbohydrate (*Khk*, *Gck*, *Pklr*) and lipid (*Acaca*, *Fasn*, *Scd*) metabolizing enzymes and transcription factors (*Mxipl*, *Srebf1*, *Ppara*) genes was studied. The consumption of HFHFrD led to the development of NAFLD, accompanied by an increase in *Gck* gene expression, a decrease in *Pklr*, *Acaca*, *Fasn*, *Scd*. RES in both doses had no effect on the development of NAFLD, as well as on the expression of the studied genes.

Keywords: non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), resveratrol, carbohydrate and lipid metabolizing enzymes, gene expression

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

Funding: this work was carried out as part of a state assignment within the framework of the Basic Scientific Research Program (topic of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation No. 0529-2019-0058).

For citation: Trusov N.V., Balakina A.S., Mzhelskaya K.V., Nikitin N.S., Aksenov I.V., Guseva G.V., Tute-lyan V.A. Effect of Resveratrol on the Development of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Rats Fed on High-Fat High-Fructose Diet. *Journal Biomed.* 2024;20(3E):221–228. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-221-228>

Submitted 08.08.2024

Revised 26.08.2024

Published 01.11.2024

Введение

Малоподвижный образ жизни и значительное увеличение в рационе населения насыщенных жиров и простых углеводов сопровождается в последние десятилетия существенным ростом распространённости неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП), которая характеризуется развитием гепатостеатоза, фиброза, внутрилобулярного (лобулярного) воспаления и баллонной дистрофии гепатоцитов. Липогенез *de novo* в печени рассматривается как один из возможных молекулярных механизмов развития ожирения и НАЖБП. Он связан с ферментами ацетил-КоА карбоксилазой, синтазой жирных кислот и стеароил-КоА десатуразой, катализирующими переход ацетил-КоА в малонил-КоА и далее в ацил-КоА с последующим образованием мононенасыщенных жирных кислот соответ-

ственно. Интенсивность синтеза жирных кислот из углеводов во многом обусловлена доступностью субстратов для липогенеза *de novo*, что в свою очередь зависит от функционального состояния ферментов гликолиза: кетогексокиназы и глюкокиназы, обеспечивающих начальную метаболическую активацию фруктозы и глюкозы соответственно, а также пируваткиназы, катализирующей конечный этап гликолиза, — превращение фосфоенолпирувата в пируват. Важную роль в липидном обмене играют транскрипционные факторы SREBP-1c и ChREBP (повышающие экспрессию генов ферментов гликолиза и липогенеза), а также PPAR α (стимулирующий β -окисление жирных кислот) [11].

Некоторые экспериментальные и клинические исследования указывают на способность полифенола ресвератрола (РЕС)

(3,4',5 тригидроксистильтена), основными источниками которого в рационе человека являются виноград, вино, арахис, фисташки, черника, клюква, какао, оказывать благоприятное воздействие на заболевания печени, включая НАЖБП [5, 6, 10]. Однако данные, описывающие влияние РЕС на экспрессию ключевых генов углеводного и липидного обмена на фоне высокожирового высокофруктозного рациона (ВЖВФР) (имитирующего широко распространённый «западный» тип питания), фрагментарны, а информация о комплексном воздействии на указанные группы генов практически отсутствует.

Материалы и методы

Все экспериментальные процедуры проводились в соответствии с рекомендациями «Международные руководящие принципы биомедицинских исследований на животных», разработанными Советом международных научных медицинских организаций, и «Руководством по уходу и использованию лабораторных животных» (the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8th edition).

Четырёхнедельные самцы крыс Wistar были получены из филиала «Столбовая» ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России» (Московская обл.). Животным давали одну неделю на акклиматизацию. Крыс размещали парами в помещении при температуре $22 \pm 2^\circ\text{C}$ при 12-часовом цикле свет/темнота. Ежедневно измеряли потребление рациона и р-ра фруктозы.

Крысы были разделены на четыре группы ($n=6$ в группе). В течение 10 недель контрольную группу кормили стандартным рационом (12% жира по калорийности) и водой; три опытные группы — высокожировым высокофруктозным рационом (ВЖВФР) (52% жира по калорийности и 20% р-р фруктозы вместо питьевой воды). Крысы двух опытных групп (ВЖВФР + РЕС10 и ВЖВФР + РЕС100) получали

РЕС в суточной дозе 10 и 100 мг/кг массы тела соответственно. Выбранные дозы РЕС были сопоставимы с дозами, используемыми в экспериментах на модельных животных и в исследованиях на добровольцах [8]. Животных выводили из эксперимента после 16-часового голодания путём декапитации под эфирным наркозом.

Образцы печени фиксировали в 10% забуференном формалине, заливали парафином, нарезали на микротоме и окрашивали гематоксилином и эозином (для обзорного осмотра) и по Ван-Гизону (для определения соединительной ткани) по стандартным методикам [3]. Гистологические образцы анализировали на оптическом микроскопе AxioImager Z1 («Karl Zeiss», Германия) с камерой AxioCamHRc («Karl Zeiss», Германия). Для получения и анализа окрашенных срезов тканей при 100-кратном увеличении использовали программу AxioVision Rel.4.8 («Karl Zeiss», Германия), оценивали по полуколичественной шкале SAF [4]. Данные с каждого слайда объединяли для определения медианы баллов в каждой группе.

Образцы печени немедленно замораживали и хранили при температуре -80°C . Тотальную РНК из ткани печени выделяли с помощью TRI Reagent («Sigma-Aldrich», США) в соответствии с инструкциями производителя. Концентрацию РНК определяли методом спектрофотометрии. Экспрессию мРНК целевых генов определяли методом TaqMan ПЦР в реальном времени с флуоресцентным красителем FAM. После выделения и определения концентрации, 2 мкг очищенной РНК подвергали обратной транскрипции для синтеза комплементарной ДНК. Далее, с использованием праймеров и зондов для кетогексокиназы (*Khk*), глюкокиназы (*Gck*), пируваткиназы (*Pklr*), ацетил-КоА карбоксилазы (*Acaca*), синтазы жирных кислот (*Fasn*), стеароил-КоА десатуразы (*Scd*), транскрипционных факторов SREBP-1c (*Srebfl*),

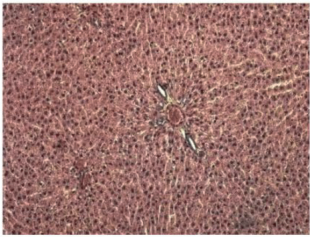
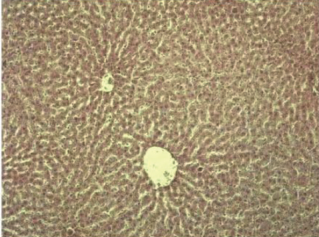
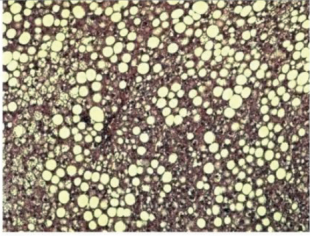
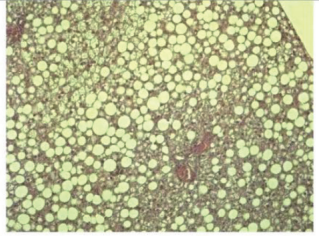
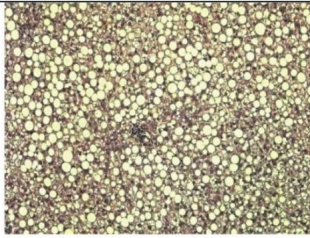
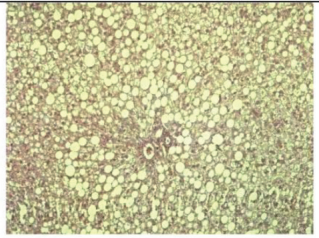
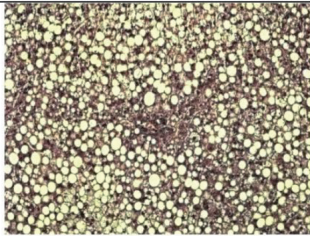
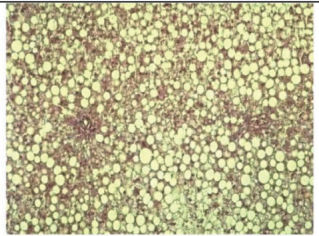
Группа животных	Окраска		Степень НАЖБП
	Гематоксилин-эозин	Ван Гизон	
Контрольная			S0 ^a A0 ^a F0
1-я опытная (ВЖВФР)			S1 ^b A1 ^{ab} F0
2-я опытная (ВЖВФР+ РЕС 10)			S1 ^{ab} A2 ^b F0
3-я опытная (ВЖВФР+ РЕС 100)			S2 ^b A2 ^{ab} F0

Рис. 1. Репрезентативные микрофотографии печени крыс (область портального тракта, ув. $\times 100$). Степень развития неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП) соответствует медиане выраженности соответствующих признаков в указанной группе крыс. Статистически значимые различия между группами обозначены разными буквами — *a* и *b*.

Fig. 1. Representative microphotographs of the rat liver (portal tract area, magn. $\times 100$). The score of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) corresponds to the median of the relevant characteristics in the specified group of rats. Statistically significant differences between groups are indicated by different letters (*a* and *b*).

ChREBP (*Mlxipl*), PPAR α (*Ppara*), а также генов домашнего хозяйства (β -актин (*Actb*) и GAPDH (*Gapdh*)), произведённых в компании «ДНК-синтез» (Россия), про-

водили ПЦР на приборе CFX96 Real-Time PCR Detection System («Bio-Rad», США), как описано ранее [9]. Экспрессию мРНК оценивали по отношению к *Actb* и *Gapdh*

и определяли методом $2^{-\Delta\Delta CT}$. Данные анализировали с помощью теста Краскела — Уоллиса с последующим пост-хок тестом Данна с использованием программного обеспечения Prism («GraphPad», США).

Результаты исследований

Гистологическое исследование не выявило отклонений в структуре печени крыс контрольной группы (S0A0F0) (рис. 1). Морфологические признаки НАЖБП наблюдались в печени крыс всех опытных групп, получавших ВЖВФР, при значительных внутригрупповых различиях в их выраженности. В печени крыс первой опытной группы (ВЖВФР) выявлены стеатоз и баллонная дистрофия гепатоцитов без фиброза (S1A1F0). ПЕС не оказал статистически значимого влияния на морфологические изменения в печени крыс, получавших ВЖВФР. Однако у крыс, получавших ПЕС в дозе 10 мг/кг массы тела, отмечена тенденция к более выраженной инфильтрации лимфоплазмодитарными элементами внутри печёночных долек (S1A2F0), а в дозе 100 мг/кг массы тела — к незначительному усилению стеатоза и баллонной дистрофии гепатоцитов (S2A2F0) по сравнению с крысами, получавшими ВЖВФР без ПЕС.

Для поиска молекулярных механизмов гепатостеатоза в печени крыс изучали экспрессию генов ферментов углеводного (*Khk*, *Gck*, *Pklr*) и липидного (*Acaca*, *Fasn*, *Scd*) обмена, а также транскрипционных факторов SREBP-1c (*Srebp1*), ChREBP (*Mlxipl*), PPAR α (*Ppara*) (рис. 2). Как показано на рис. 2А, у крыс, получавших ВЖВФР, наблюдалась тенденция к снижению уровня мРНК кетогексокиназы (*Khk*, фруктокиназы) (на 34%, $p=0,076$) и статистически значимое повышение уровня мРНК глюкокиназы (*Gck*) (на 2085%) и снижение уровня мРНК фермента печени пируваткиназы (*Pklr*) (79%) по сравнению с контрольной группой. В то же время наблюдалось подавление экспрессии генов всех изученных

ферментов *de novo* липогенеза: ацетил-КоА карбоксилазы альфа (*Acaca*) (на 70%), синтазы жирных кислот (*Fasn*) (на 84%) и стеароил-КоА десатуразы (*Scd*) (на 97%) (рис. 2В). Уровень мРНК факторов транскрипции PPAR α , ChREBP и SREBP-1c не претерпел значительных изменений (рис. 2С). ПЕС статистически значимо не изменял экспрессию генов по сравнению с ВЖВФР, однако наблюдалась тенденция к снижению уровня мРНК глюкокиназы (*Gck*), наиболее выраженной при использовании ПЕС в дозе 100 мг/кг/сут (на 51%, $p=0,096$).

Обсуждение результатов

Анализ литературных данных не позволяет сделать однозначный вывод о влиянии ПЕС при НАЖБП, в т. ч. на экспрессию генов ферментов углеводного и липидного обмена и участвующих в их регуляции транскрипционных факторов, что может быть связано с различными условиями эксперимента (состав рациона, доза ПЕС, период кормления и т. д.). ПЕС в суточной дозе 100 мг/кг м.т. в течение 4 недель снижал уровень триглицеридов и уменьшал проявления НАЖБП, но не влиял на экспрессию генов ацетил-КоА карбоксилазы, синтазы жирных кислот, стеароил-КоА десатуразы, а также SREBP-1c и PPAR α в печени мышей, получавших высокожировой рацион (60% жира по калорийности) [5]. У крыс, получавших рацион с высоким содержанием жира (45% жира), ПЕС в дозе 30 мг/кг/сут в течение 6 недель приводил к снижению активности ацетил-КоА карбоксилазы в печени, не влияя на активность синтазы жирных кислот и экспрессию генов транскрипционных факторов PPAR α и SREBP-1c [1]. В работе [10] добавление ПЕС в дозе 100 мг/кг/сут в течение 10 недель уменьшало выраженность НАЖБП за счёт снижения экспрессии генов *SREBP-1c* и синтазы жирных кислот в печени крыс, получавших высокожировой рацион (59%

жира), что может быть связано с влиянием полифенола на АМФ-активируемую протеинкиназу. В эксперименте [2] на крысах, которых кормили высокожировой диетой (45% жира) в течение 6 недель, РЕС в дозе 15 мг/кг/сут не влиял на активность син-

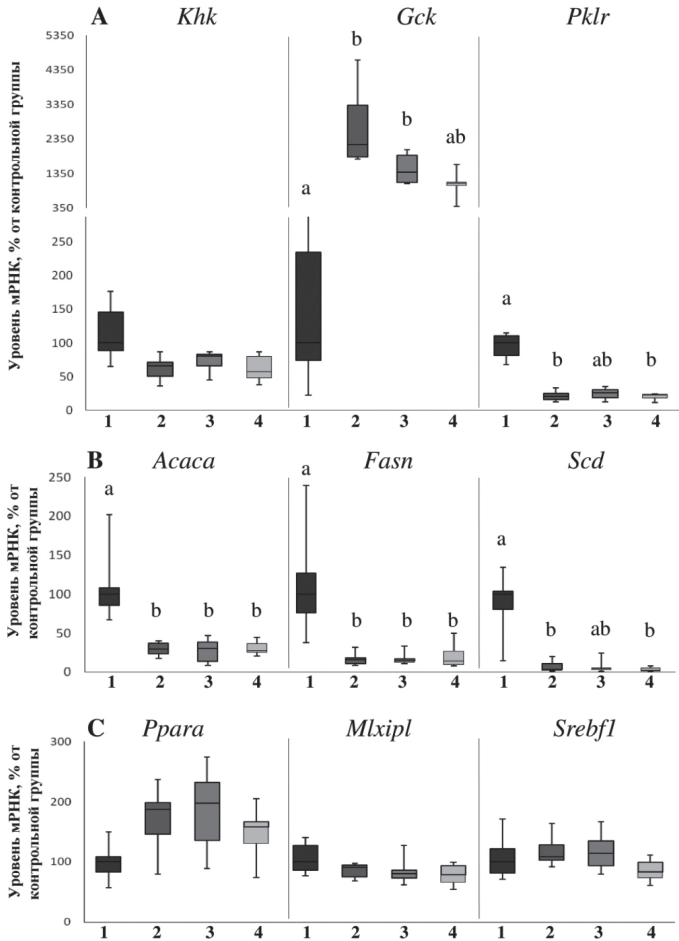


Рис. 2. Уровень мРНК генов ферментов углеводного (А) и липидного (В) обмена, а также транскрипционных факторов (С) в печени крыс, получавших высокожировую высокофруктозный рацион (ВЖВФР) и ресвератрол (РЕС). 1 — контрольная группа; 2 — ВЖВФР; 3 — ВЖВФР+РЕС в дозе 10 мг/кг м.т.; 4 — ВЖВФР+РЕС в дозе 100 мг/кг м.т. (% от контроля). Данные представлены в виде медианы, интерквартильного размаха, максимального и минимального значения. Уровень мРНК целевых генов в опытных группах (2, 3 и 4) определяли относительно уровней мРНК генов *Actb* и *Gapdh* методом ПЦР в реальном времени по сравнению с медианными значениями в контрольной группе (1). Статистически значимые различия ($p < 0,05$) между группами обозначены разными буквами (а и b).

Fig. 2. Gene expression of carbohydrate (A), lipid metabolizing enzymes (B) and transcription factors (C) in the liver of rats fed on high fat high-fructose diet and resveratrol. 1 – control group; 2 – high-fat high-fructose diet (HFHFrD); 3 – HFHFrD + 10 mg resveratrol/kg b.w.; 4 – HFHFrD + 100 mg resveratrol/kg b.w. (in % of control). Results are expressed as median, interquartile range, maximum and minimum values. mRNA abundance related to *Actb* and *Gapdh* was determined using real-time PCR. The data are presented relative to the median of the control group (1). Statistically significant differences ($p < 0.05$) between groups are indicated by different letters (a and b).

тазы жирных кислот и экспрессию PPAR α , однако наблюдалось снижение активности ацетил-КоА карбоксилазы в печени. В другом исследовании PEC в дозе 100 мг/кг/сут в течение 6 недель не оказывал существенного влияния на экспрессию гена *SREBP-1c* в печени крыс, которых кормили высокохолестериновым рационом с высоким содержанием жира (65% жира) [8].

Способность PEC подавлять экспрессию гена глюкокиназы в гепатоцитах крыс, отмеченная в нашем исследовании, была также обнаружена в работе [7], что может быть связано с опосредованным FoxO1 подавлением транскрипционной активности *HNF-4a*. Наряду с этим в другом исследовании было показано отсутствие эффекта PEC на экспрессию *HNF-4a* на фоне высокожирового рациона [5]. Учитывая отсутствие значимого влияния полифенола на экс-

прессию *Srebfl* в нашей работе, вероятным механизмом ингибирующего действия PEC на *Gck* может быть влияние других транскрипционных факторов, таких как *HIF-1*, *USF1* и *USF2* [7].

Выводы

Ресвератрол в обеих использованных дозах не оказывает существенного влияния на развитие НАЖБП, а также на экспрессию генов, связанных с углеводным и липидным обменом, в печени крыс, получавших ВЖВФР. Это подчёркивает сложное действие биологически активных веществ, которые могут оказывать различные эффекты в зависимости от комбинаций и используемых доз. Дальнейшие исследования могут помочь более чётко установить, каковы эффекты полифенолов и характер биологических процессов, вовлечённых в их действие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Alberdi G., Rodríguez V.M., Macarulla M.T., Miranda J., Churruga I., Portillo M.P. Hepatic lipid metabolic pathways modified by resveratrol in rats fed an obesogenic diet. *Nutrition*. 2013;29(3):562–567. DOI: 10.1016/j.nut.2012.09.011
2. Arias N., Macarulla M.T., Aguirre L., Miranda J., Portillo M.P. Liver delipidating effect of a combination of resveratrol and quercetin in rats fed an obesogenic diet. *J. Physiol. Biochem*. 2015;71(3):569–576. DOI: 10.1007/s13105-015-0403-2
3. Bancroft J.D., Gamble M. *Theory and Practice of Histological Techniques*, 5th ed. Edinburgh, Churchill Livingstone Publ., 2002.
4. Bedossa P. The FLIP Pathology Consortium. Utility and appropriateness of the fatty liver inhibition of progression (FLIP) algorithm and steatosis, activity, and fibrosis (SAF) score in the evaluation of biopsies of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2014;60(2):565–575. DOI: 10.1002/hep.27173
5. Cheng K., Song Z., Zhang H., Li S., Wang C., Zhang L., Wang T. The therapeutic effects of resveratrol on hepatic steatosis in high-fat diet-induced obese mice by improving oxidative stress, inflammation and lipid-related gene transcriptional expression. *Med. Mol. Morphol*. 2019;52(4):187–197. DOI: 10.1007/s00795-019-00216-7
6. Faghihzadeh F., Hekmatdoost A., Adibi P. Resveratrol and liver: A systematic review. *J. Res. Med. Sci*. 2015;20(8):797–810. DOI: 10.4103/1735-1995.168405
7. Ganjam G.K., Dimova E.Y., Unterman T.G., Kietzmann T. FoxO1 and HNF-4 are involved in regulation of hepatic glucokinase gene expression by resveratrol. *J. Biol. Chem*. 2009;284(45):30783–30797. DOI: 10.1074/jbc.M109.045260
8. Heeboll S., Thomsen K.L., Clouston A., Sundelin E.I., Radko Y., Christensen L.P., Ramezani-Moghadam M., Kreutzfeldt M., Pedersen S.B., Jessen N., Hebbard L., George J., Grønbaek H. Effect of resveratrol on experimental non-alcoholic steatohepatitis. *Pharmacol. Res*. 2015;95–96:34–41. DOI: 10.1016/j.phrs.2015.03.005
9. Mzhelskaya K.V., Trusov N.V., Guseva G.V., Aksekov I.V., Kravchenko L.V., Tutelyan V.A. Effects of quercetin on liver carbohydrate and lipid metabolism enzyme gene expression in rats fed a high-fructose diet. *Bull. Exp. Biol. Med*. 2019;167(2):263–266. DOI: 10.1007/s10517-019-04505-0
10. Shang J., Chen L.L., Xiao F.X., Sun H., Ding H.C., Xiao H. Resveratrol improves non-alcoholic fatty liver disease by activating AMP-activated protein kinase. *Acta Pharmacol. Sin*. 2008;29(6):698–706. DOI: 10.1111/j.1745-7254.2008.00807.x
11. Softic S., Cohen D.E., Kahn C.R. Role of dietary fructose and hepatic *de novo* lipogenesis in fatty liver disease. *Dig. Dis. Sci*. 2016;61(5):1282–1293. DOI: 10.1007/s10620-016-4054-0

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Трусов Никита Вячеславович*, ФГБУН
«Федеральный исследовательский центр пита-
ния, биотехнологии и безопасности пищи»;
e-mail: nikkitosu@yandex.ru

Nikita V. Trusov*, Federal Research Center
for Nutrition, Biotechnology and Food Safety;
e-mail: nikkitosu@yandex.ru

Балакина Анастасия Станиславовна, к.б.н.,
ФГБУН «Федеральный исследовательский
центр питания, биотехнологии и безопасности
пищи»;
e-mail: balakina.a.s@yandex.ru

Anastasia S. Balakina, Cand. Sci. (Biol.), Federal
Research Center for Nutrition, Biotechnology
and Food Safety;
e-mail: balakina.a.s@yandex.ru

Мжельская Кристина Владимировна, ФГБУН
«Федеральный исследовательский центр пита-
ния, биотехнологии и безопасности пищи»;
e-mail: kristik13@yandex.ru

Kristina V. Mzhelskaya, Federal Research Center
for Nutrition, Biotechnology and Food Safety;
e-mail: kristik13@yandex.ru

Никитин Николай Сергеевич, ФГБУН
«Федеральный исследовательский центр пита-
ния, биотехнологии и безопасности пищи»;
e-mail: nikolay_sergeevich87@mail.ru

Nikolay S. Nikitin, Federal Research Center
for Nutrition, Biotechnology and Food Safety;
e-mail: nikolay_sergeevich87@mail.ru

Аксенов Илья Владимирович, к.м.н., ФГБУН
«Федеральный исследовательский центр пита-
ния, биотехнологии и безопасности пищи»;
e-mail: ilyaaksenoff@yandex.ru

Ilya V. Aksenov, Cand. Sci. (Med.), Federal
Research Center for Nutrition, Biotechnology
and Food Safety;
e-mail: ilyaaksenoff@yandex.ru

Гусева Галина Владимировна, к.б.н., ФГБУН
«Федеральный исследовательский центр пита-
ния, биотехнологии и безопасности пищи»;
e-mail: mailbox@ion.ru

Galina V. Guseva, Cand. Sci. (Biol.), Federal
Research Center for Nutrition, Biotechnology
and Food Safety;
e-mail: mailbox@ion.ru

Тутельян Виктор Александрович, акад. РАН,
д.м.н., проф., ФГБУН «Федеральный исследова-
тельский центр питания, биотехнологии и без-
опасности пищи»;
e-mail: mailbox@ion.ru

Victor A. Tutelyan, Acad. of RAS, Dr. Sci. (Med.),
Prof., Federal Research Center for Nutrition,
Biotechnology and Food Safety;
e-mail: mailbox@ion.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

<https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-229-232>



ИЗУЧЕНИЕ АНКСИОЛИТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ АНТАГОНИСТА TRPV1 РЕЦЕПТОРОВ В ТЕСТЕ «ТЁМНАЯ/СВЕТЛАЯ КАМЕРА» НА МЫШАХ ICR

А.Ю. Федотова^{1,2,*}, В.М. Павлов^{1,2}

¹ Филиал ФГБУН ГНЦ РФ Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН
142290, Российская Федерация, Московская обл., Пушкино, просп. Науки, 6

² Пушкинский филиал ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет»
142290, Российская Федерация, Московская обл., Пушкино, просп. Науки, 3

TRPV1, являющийся ключевым медиатором передачи ноцицептивных сигналов, широко распространён в различных тканях и клетках, включая центральную нервную систему. Регуляторная активность TRPV1 оказывает воздействие на нервную десенсибилизацию, передачу болевых импульсов и нейротрансмиттерные системы. Использование полезного пептида APHC3 как селективного антагониста TRPV1 является методом исследования блокировки данного канала на уровне тревожности и представляет собой реакцию на стресс у мышей. Результаты исследования могут расширить наше понимание о влиянии TRPV1 на сдерживание эмоциональных состояний. Данное исследование имеет важное значение для осознанного воздействия TRPV1 на стресс у мышей ICR, а также может послужить исследованиям в области медицины и биомедицины.

Ключевые слова: TRPV1, APHC3, стресс, мыши ICR, *in vivo*

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: данная работа финансировалась за счёт средств бюджета лаборатории биологических испытаний Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.

Для цитирования: Федотова А.Ю., Павлов В.М. Изучение анксиолитических свойств антагониста TRPV1 рецепторов в тесте «Тёмная/светлая камера» на мышах ICR. *Биомедицина*. 2024;20(3E): 229–232. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-229-232>

Поступила 15.04.2024

Принята после доработки 22.07.2024

Опубликована 01.11.2024

ANXIOLYTIC PROPERTIES OF THE TRPV1 RECEPTOR ANTAGONIST IN A DARK/LIGHT CHAMBER TEST ON ICR MICE

Anastasia Yu. Fedotova^{1,2,*}, Vladimir M. Pavlov^{1,2}

¹ Branch of the Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry
of the Russian Academy of Sciences
142290, Russian Federation, Moscow Region, Pushchino, Nauki Ave., 6

² Pushchino Branch of the Russian Biotechnological University
142290, Russian Federation, Moscow Region, Pushchino, Nauki Ave., 3

TRPV1, a key mediator of nociceptive signaling, is widely distributed in various tissues and cells, including the central nervous system. The regulatory activity of TRPV1 affects neural desensitization, pain transmission, and neurotransmitter systems. The use of the beneficial peptide APHC3 as a selective antagonist

of TRPV1 is a method for studying the blocking of this channel at the level of anxiety and is a response to stress in mice. The findings improve our understanding of the influence of TRPV1 on the moderation of emotional states. This study has important implications for understanding the effects of TRPV1 on stress states in ICR mice and may also contribute to medical and biomedical research.

Keywords: TRPV1, APHC3, stress, ICR mice, *in vivo*

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

Funding: this work was funded from the budget of the Laboratory of Biological Tests of the Branch of the Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences.

For citation: Fedotova A.Yu., Pavlov V.M. Anxiolytic Properties of the TRPV1 Receptor Antagonist in a Dark/Light Chamber Test on ICR Mice. *Journal Biomed.* 2024;20(3E):229–232. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-229-232>

Submitted 15.04.2024

Revised 22.07.2024

Published 01.11.2024

Введение

Рецептор TRPV1 (транзистентный потенциал ваниллоидного типа 1) принадлежит семейству трансмембранных ионных каналов и играет ключевую роль в передаче сигналов болевой чувствительности и температурных стимулов в организме [5]. TRPV1 является одним из основных рецепторов, ответственных за восприятие острой боли и ощущений, связанных с высокими температурами.

Он широко распространён в ЦНС, присутствует в ганглиях спинного мозга, в нейронах гиппокампа, гипоталамуса и других областей мозга. Также рецепторы встречаются в других тканях и органах организма [2]. Основными стимуляторами для активации TRPV1 являются капсаицин, а также различные тепловые стимулы и некоторые химические соединения. Активация TRPV1 приводит к открытию канала для ионов кальция (Ca^{2+}), что в свою очередь вызывает деполяризацию мембраны и генерацию акционных потенциалов в нервных клетках [7]. Это важно для передачи информации о болевых и температурных стимулах в ЦНС. Отмечается, что активация TRPV1 в различных участках мозга может оказывать анксиолитический эффект, снижая уровень тревожности и способствуя ощу-

щению расслабления. Например, активация TRPV1 в некоторых регионах головного мозга может снижать уровень тревожности и стимулировать ощущение расслабления [3].

Селективный антагонист TRPV1 канала — пептид АРНСЗ — был выбран нами в качестве исследуемого объекта. Этот пептид был выделен из морской анемоны *Heteractis crispa*. Научные исследования свидетельствуют о том, что данный пептид проявляет свою эффективность в снижении воспаления и облегчении боли при ревматоидном и остеоартрите, а также при острой и хронической боли [4, 9, 10]. Нейропротективная активность пептида АРНСЗ была показана в *in vitro* исследованиях. В проведённых ранее исследованиях *in vivo* было показано, что он обладает анальгетической, противовоспалительной и гипотермической активностью [8].

Материалы и методы

В исследовании был использован пептид АРНСЗ, полученный путём гетерологичной экспрессии в *E. coli* [6].

Исследование проведено на базе лаборатории биологических испытаний Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. В основе дизайна исследования лежали

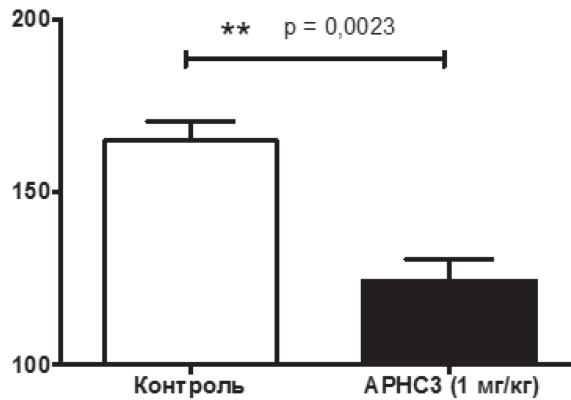


Рис. Результаты теста «Тёмная/светлая камера». Время нахождения в темной камере (сек). Результаты представлены как среднее значение $\pm$ SD; ** — $p < 0,01$ по сравнению с группой контроля (непараметрический тест Манна — Уитни).

Fig. Results of the dark/light camera test. The time spent in a dark cell (sec.). The results are presented as an average value $\pm$ SD; ** — $p < 0.01$ compared with the control group (nonparametric Mann — Whitney test).

рекомендации «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [1]. Для проведения исследования было взято 16 самцов белых половозрелых мышей аутбредной линии ICR статуса SPF массой 20–30 г, возраст 7–8 недель (НПП Питомник лабораторных животных ФИБХ РАН, Московская обл.). Животные размещались по 4 особи в поликарбонатные клетки (тип 3, размеры 425×266×155 мм).

Все животные были разделены на две группы по 8 животных. Объем введения тестируемого препарата для всех животных составлял 2 мл/кг. Животным группы 1 вводили физ. р-р («Обновление», Россия), а животные группы 2 получали АРНСЗ в дозе 1 мг/кг. Через 30 мин после введения препаратов проводился функциональный тест «Тёмная/светлая камера».

Методика использования тёмной/светлой камеры в установке «TSE Multiconditioning System» основана на естественной склонности грызунов избегать сильно освещённых областей. В данном эксперименте животных помещали в ярко освещённую часть двухкамерной установки и за 5 мин

фиксировали количество переходов между светлой и тёмной зонами, а также время, проведённое в каждой из них.

Результаты исследований

По результатам теста «Тёмная/светлая камера» у животных группы 1 было отмечено естественное стремление избегать областей с ярким освещением, проявляя предпочтение к пребыванию в условиях низкой освещённости. Животные же группы 2, получавшие пептид АРНСЗ в дозе 1 мг/кг, наоборот, продемонстрировали снижение времени, проведённого в тёмной камере, на 25% по сравнению с контрольной группой.

Выводы

В ходе исследования было установлено, что пептид АРНСЗ, функционирующий как селективный ингибитор TRPV1 канала, обладает анксиолитическим эффектом при введении внутримышечно в дозе 1 мг/кг. Этот пептид оказывает снижающее воздействие на уровень тревожности у животных, что придаёт значимость продолжению исследований для определения оптимального диапазона его эффективных доз.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*. Под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К., 2012. [*Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv* [Guidelines for conducting preclinical studies of medicines]. Ed. by A.N. Mironov. Moscow: Grif I K. Publ., 2012. (In Russian)].
2. Aghazadeh T.M., Baraldi P.G., Baraldi S., Gessi S., Merighi S., Borea P.A. Medicinal chemistry, pharmacology, and clinical implications of TRPV1 receptor antagonists. *Med. Res. Rev.* 2017;37(4):936–983. DOI: 10.1002/med.21427
3. Aguiar D.C., Terzian A.L., Guimarães F.S., Moreira F.A. Anxiolytic-like effects induced by blockade of transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) channels in the medial prefrontal cortex of rats. *Psychopharmacology (Berl.)*. 2009;205(2):217–225. DOI: 10.1007/s00213-009-1532-5
4. Andreev Ya.A., Kozlov S.A., Korolkova Y.V., Dyachenko I.A., Bondarenko D.A., Skobtsov D.I., Murashev A.N., Kotova P.D., Rogachevskaja O.A., Kabanova N.V., Kolesnikov S.S., Grishin E.V. Polypeptide modulators of TRPV1 produce analgesia without hyperthermia. *Mar. Drugs*. 2013;11(12):5100–5115. DOI: 10.3390/md11125100
5. Bevan S., Quallo T., Andersson D.A. TRPV1. *Handb. Exp. Pharmacol.* 2014;222:207–245. DOI: 10.1007/978-3-642-54215-2_9
6. Esipov R.S., Makarov D.A., Stepanenko V.N., Kostromina M.A., Muravyova T.I., Andreev Ya.A., Dyachenko I.A., Kozlov S.A., Grishin E.V. Pilot production of the recombinant peptide toxin of *Heteractis crista* as a potential analgesic by intein-mediated technology. *Protein Expr. Purif.* 2018;145:71–76. DOI: 10.1016/j.pep.2017.12.011
7. Katz B., Zaguri R., Edvardson S., Maayan C., Elpeleg O., Lev S., Davidson E., Peters M., Kfir-Erenfeld S., Berger E., Ghazalin S., Binshtok A.M., Minke B. Nociception and pain in humans lacking a functional TRPV1 channel. *J. Clin. Invest.* 2023;133(3):e153558. DOI: 10.1172/JCI153558
8. Kolesova Y.S., Stroylova Y.Y., Maleeva E.E., Moysenovich A.M., Pozdyshev D.V., Muronetz V.I., Andreev Ya.A. Modulation of TRPV1 and TRPA1 Channels function by sea anemones' peptides enhances the viability of SH-SY5Y cell model of Parkinson's disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2024;25(1):368. DOI: 10.3390/ijms25010368
9. Kozlov S.A., Andreev Ia.A., Murashev A.N., Skobtsov D.I., Dyachenko I.A., Grishin E.V. New polypeptide components from the *Heteractis crista* sea anemone with analgesic activity. *Bioorg. Chem.* 2009;35(6):711–719. DOI: 10.1134/s1068162009060065
10. Logashina Yu.A., Palikova Y.A., Palikov V.A., Kazakov V.A., Smolskaya S.V., Dyachenko I.A., Tarasova N.V., Andreev Ya.A. Anti-inflammatory and analgesic effects of TRPV1 polypeptide modulator APHC3 in models of osteo- and rheumatoid arthritis. *Mar. Drugs*. 2021;19(1):39. DOI: 10.3390/md19010039

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Федотова Анастасия Юрьевна*, Филиал ФГБУН ГНЦ РФ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пущинский филиал ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет»;
e-mail: anastasiafedotova18@gmail.com

Павлов Владимир Михайлович, Филиал ФГБУН ГНЦ РФ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пущинский филиал ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет»;
e-mail: v.m.pavlov29@gmail.com

Anastasia Yu. Fedotova*, Branch of the Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Pushchino Branch of the Russian Biotechnological University;
e-mail: anastasiafedotova18@gmail.com

Vladimir M. Pavlov, Branch of the Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Pushchino Branch of the Russian Biotechnological University;
e-mail: v.m.pavlov29@gmail.com

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

<https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-233-237>



ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ β -АМИЛОИДНОГО ПЕПТИДА С ИНСУЛИНОМ ДЕТЕМИР МЕТОДАМИ БИОСЛОЙНОЙ ИНТЕРФЕРОМЕТРИИ И МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

М.П. Шевелёва, Е.И. Дерюшева, Е.Л. Немашкалова, А.А. Вологжанникова,
А.А. Назипова, Е.А. Литус*

Институт биологического приборостроения ФГБУН ФИЦ
«Пушкинский научный центр биологических исследований» РАН
142290, Российская Федерация, Московская обл., Пушкино, ул. Институтская, 7

Исследование взаимодействий β -амилоидного пептида (А β) с белковыми и пептидными лигандами является актуальной задачей. Большой интерес представляет изучение комплексов А β с лекарственными средствами, которые рассматриваются в качестве перспективных кандидатов для терапии болезни Альцгеймера. К данной категории относится группа гипогликемических препаратов, в т. ч. инсулин детемир, аналог инсулина длительного действия. В данной работе методом биослойной интерферометрии впервые получены кинетические и равновесные параметры взаимодействия инсулина детемир с мономерными формами А β с длиной цепи 40 и 42 аминокислоты, а также предложена модель комплексов «инсулин детемир – А β 40/42». Полученные данные могут быть использованы для изучения механизмов влияния инсулина детемир на когнитивные функции пациентов с диагнозом болезнь Альцгеймера.

Ключевые слова: инсулин детемир, β -амилоидный пептид, болезнь Альцгеймера

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда № 20-74-10072.

Для цитирования: Шевелёва М.П., Дерюшева Е.И., Немашкалова Е.Л., Вологжанникова А.А., Назипова А.А., Литус Е.А. Изучение взаимодействия β -амилоидного пептида с инсулином детемир методами биослойной интерферометрии и молекулярного моделирования. *Биомедицина*. 2024;20(3E):233–237. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-233-237>

Поступила 10.04.2024

Принята после доработки 23.08.2024

Опубликована 01.11.2024

INTERACTION OF β -AMYLOID PEPTIDE WITH INSULIN DETEMIR STUDIED BY BIOLAYER INTERFEROMETRY AND MOLECULAR MODELLING

Marina P. Shevelyova, Evgeniya I. Deryusheva, Ekaterina L. Nemashkalova,
Alisa A. Vologzhannikova, Aliya A. Nazipova, Ekaterina A. Litus*

Institute for Biological Instrumentation, Pushchino Scientific Center for Biological Research
of the Russian Academy of Sciences
142290, Russian Federation, Moscow Region, Pushchino, Institutskaya Str., 7

The study of β -amyloid peptide (А β) interactions with protein and peptide ligands is a relevant research task. А β complexes with drugs that are considered as promising candidates for the therapy of Alzheimer's disease are of particular interest. This category includes a group of hypoglycemic drugs, such as insulin detemir, a long-acting insulin analogue. In this work, the method of biolayer interferometry is used to ob-

tain the kinetic and equilibrium parameters of interaction of insulin detemir and monomeric A β forms with a chain length of 40 and 42 amino acids. A model of “insulin detemir–A β 40/42” complexes is proposed. The data obtained can be used to study the mechanisms of the effect of insulin detemir on cognitive functions of patients with Alzheimer’s disease.

Keywords: insulin detemir, β -amyloid peptide, Alzheimer’s disease

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

Funding: the research was funded by the Russian Science Foundation, grant No. 20-74-10072.

For citation: Shevelyova M.P., Deryusheva E.I., Nemashkalova E.L., Vologzhannikova A.A., Nazipova A.A., Litus E.A. Interaction of β -amyloid Peptide with Insulin Detemir Studied by Biolayer Interferometry and Molecular Modelling. *Journal Biomed.* 2024;20(3E):233–237. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-233-237>

Submitted 10.04.2024

Revised 23.08.2024

Published 01.11.2024

Введение

Исследование взаимодействий β -амилоидного пептида (A β) с лигандами различной природы является актуальной задачей как с точки зрения пополнения знаний о механизмах развития болезни Альцгеймера (БА), так и в связи с поиском эффективных способов её терапии и профилактики. Особый интерес представляет изучение комплексов мономерной формы A β . Создание библиотеки взаимодействий A β с указанием кинетических и равновесных параметров образования комплекса может послужить базой для поиска взаимодействий A β , значимых *in vivo*. Особенно актуально изучение комплексов A β с лекарственными средствами, которые могут быть использованы для лечения БА. Так, например, интраназальное применение инсулина детемир (одной из пролонгированных форм инсулина) положительно влияло на память пациентов с БА, носителей аллели ApoE ϵ 4, и ухудшало память пациентов с БА, не имеющих данной аллели в своём генотипе [1]. В то же время взаимодействие инсулина детемир с мономерной формой A β до сих пор не изучено. В нашей работе было проведено исследование взаимодействия мономерных форм A β с длиной цепи 40 и 42 аминокислотных остатка (A β 40/42) с инсулином детемир: методом биослойной

интерферометрии (БСИ) получены кинетические и равновесные параметры их взаимодействия, а также методом молекулярного моделирования построена модель их комплексов.

Материалы и методы

В ходе исследований были использованы рекомбинантный человеческий A β 40/42, полученный по методике, разработанной в нашей лаборатории [3], и инсулин детемир производства Novo Nordisk (торговое название — Левемир). Взаимодействие A β 40/42 с инсулином детемир исследовали методом БСИ с использованием системы Octet QKe (ForteBio). A β 40/42 использовался в качестве лиганда, в качестве анализата был использован р-р инсулина детемир (5–10 мкМ) в буфере 20 мМ Трис-HCl, 140 мМ NaCl, 4,9 мМ KCl, 1 мМ MgCl₂, 2,5 мМ CaCl₂, pH=7,4. Данные анализировали с помощью программного обеспечения ForteBio Data Analysis Software. Для аппроксимации использовали модель гетерогенного лиганда. Моделирование комплекса исследуемых молекул проводилось на основе трёхмерных структур инсулина детемир (PDB ID: 1XDA цепи A, B, X-RAY) и A β (PDB ID: 2LFM, 1–40, NMR; PDB ID: 1Z0Q, 1–42, NMR) с помощью программы ClusPro (<https://cluspro.org/login.php?redir=/home.php>).

Обработка полученных комплексов проводилась по алгоритму, описанному нами в работе [2]. Визуализация комплексов была реализована с помощью программы PyMol (<https://pymol.org/2>). Остатки пронумерованы в соответствии с трёхмерными структурами молекул.

Результаты исследований

На рис. 1 представлены результаты определения параметров взаимодействия Аβ40/42 с инсулином детемир методом БСИ. Значения равновесных констант диссоциации близки в пределах погрешности для двух изоформ Аβ как для первой рав-

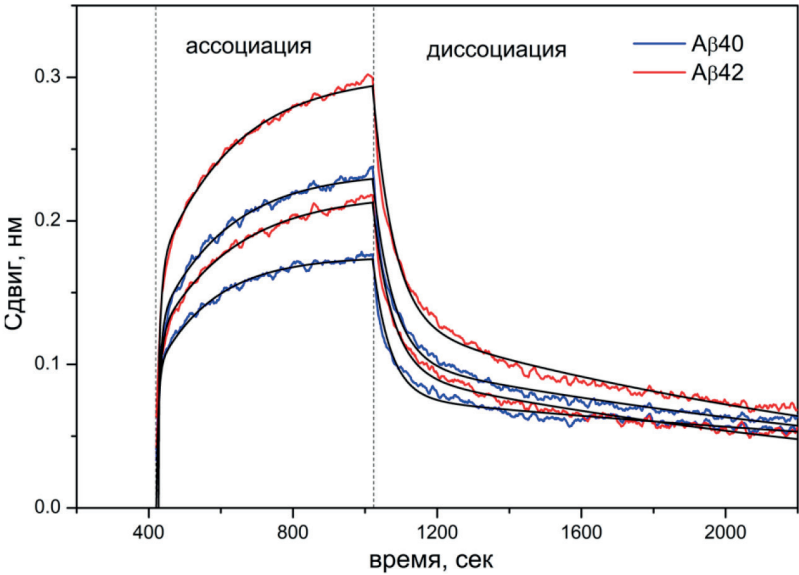


Рис. 1. Сенсограмма взаимодействия Аβ40/42 с инсулином детемир (5–10 мкМ), полученная методом БСИ.
Примечание: синим цветом для Аβ40 и красным для Аβ42 показана зависимость сдвига длины волны (отклика) от времени в процессе ассоциации и диссоциации, черными линиями показана аппроксимация экспериментальных данных моделью гетерогенного лиганда 2:1.
Fig. 1. Sensorgram of the interaction of Аβ40/42 with insulin detemir (5–10 μM), obtained by biolayer interferometry.
Note: the time dependence of the wavelength shift (response) during association and dissociation is shown for Аβ40 (blue) and Аβ42 (red); the black lines show the approximation of the experimental data by the 2:1 heterogeneous ligand model.

Таблица. Кинетические и термодинамические константы взаимодействия Аβ40/42 с инсулином детемир
Table. Kinetic and thermodynamic constants of interaction of Аβ40/42 with insulin detemir

k_{a1}^1 $\times 10^2$ 1/(М·сек)	k_{d1}^1 $\times 10^{-4}$ 1/сек	K_{D1}^1 $\times 10^{-7}$ М	k_{a2}^1 $\times 10^4$ 1/(М·сек)	k_{d2}^1 $\times 10^{-2}$ 1/сек	K_{D2}^1 $\times 10^{-6}$ М
Аβ40					
8,2±5,1	4,0±1,2	4,88±0,45	2,0±1,5	1,91±0,21	0,96±0,78
Аβ42					
6,14±2,83	5,85±0,13	9,53±0,46	1,45±0,63	1,77±0,11	1,22±0,60

Примечание: в качестве погрешностей приведены величины стандартного отклонения среднего.
Note: the standard deviation values of the mean are given as errors.

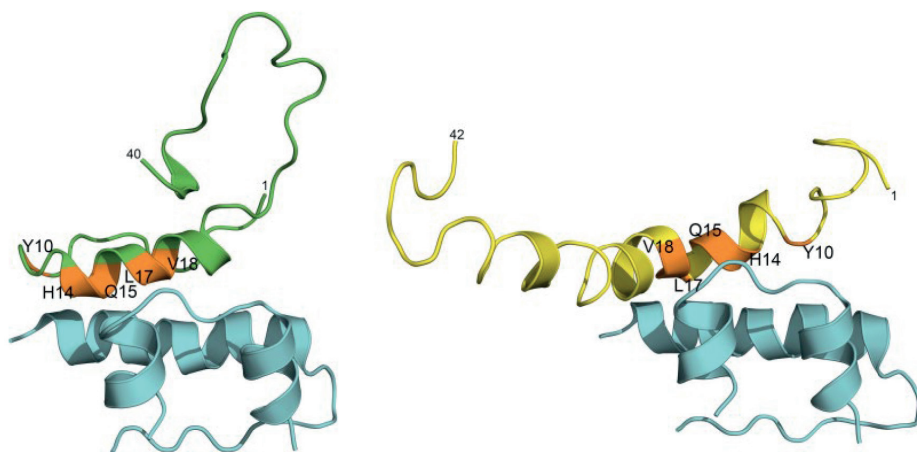


Рис. 2. Модели комплексов «Аβ40 (слева) / Аβ42 (справа) – инсулин детемир», полученные методом молекулярного моделирования с помощью программы ClusPro на основе трёхмерных структур инсулина детемир (выделен голубым цветом) и Аβ (Аβ40 выделен зелёным цветом; Аβ42 выделен жёлтым цветом). Аминокислотные остатки, общие для Аβ40 и Аβ42, взаимодействующие с инсулином детемир (Y10, H14, Q15, L17 и V18), выделены оранжевым и подписаны.

Fig. 2. Models of the “Aβ40 (left) / Aβ42 (right) – insulin detemir” complexes obtained by molecular modeling using the ClusPro program based on the three-dimensional structures of insulin detemir (highlighted in blue) and Aβ (Aβ40 in green; Aβ42 in yellow). Amino acid residues common to Aβ40 and Aβ42 that interact with insulin detemir (Y10, H14, Q15, L17 and V18) are highlighted in orange and labeled.

новесной константы диссоциации (K_{D1}), так и для K_{D2} .

Модели комплексов «Аβ40/42 – инсулин детемир», полученные методом молекулярного моделирования с помощью программы ClusPro, приведены на рис. 2.

Анализ полученных моделей комплексов показал, что Аβ40 имеет большее число контактов с инсулином детемир, чем Аβ42 (за счёт входящих в комплекс N-концевых остатков пептида). Общие аминокислотные остатки для Аβ40 и Аβ42, взаимодействующие с инсулином детемир: Y10, H14, Q15, L17 и V18. Области связывания, расположенные на обеих цепях молекулы инсулина

детемир (PDB ID: 1XDA цепи A, B), схожи для Аβ40 и Аβ42.

Выводы

В данной работе впервые было проведено исследование взаимодействия мономерных форм Аβ40/42 с инсулином детемир, были получены кинетические и равновесные параметры их взаимодействия, а также предложена модель их комплексов. Полученные данные могут быть использованы для изучения влияния инсулина детемир на метаболизм Аβ и когнитивные функции пациентов с диагнозом болезнь Альцгеймера [4].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

- Claxton A., Baker L.D., Hanson A., Trittschuh E.H., Cholerton B., Morgan A., Callaghan M., Arbuckle M., Behl C., Craft S. Long-acting intranasal insulin detemir improves cognition for adults with mild cognitive impairment or early-stage Alzheimer's disease dementia. *J. Alzheimers Dis.* 2015;44(3):897–906. DOI: 10.3233/jad-141791
- Kazakov A.S., Deryusheva E.I., Sokolov A.S., Permyakova M.E., Litus E.A., Rastrygina V.A., Uversky V.N., Permyakov E.A., Permyakov S.E. Erythropoietin interacts with specific S100 proteins. *Biomolecules.* 2022;12(1):120. DOI: 10.3390/biom12010120
- Litus E.A., Kazakov A.S., Deryusheva E.I., Nemashkalova E.L., Shevel'yova M.P., Nazipova A.A.,

Permyakova M.E., Raznikova E.V., Uversky V.N., Permyakov S.E. Serotonin promotes serum albumin interaction with the monomeric amyloid β peptide. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(11):5896. DOI: 10.3390/ijms22115896

4. Vandal M., Bourassa P., Calon F. Can insulin signaling pathways be targeted to transport A β out of the brain? *Front. Aging Neurosci.* 2015;7:114. DOI: 10.3389/fnagi.2015.00114

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Шевелёва Марина Петровна, к.х.н., Институт биологического приборостроения ФГБУН ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований» РАН;

e-mail: marina.shevelyova@gmail.com

Marina P. Shevelyova, Cand. Sci. (Chem.), Institute for Biological Instrumentation, Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences;

e-mail: marina.shevelyova@gmail.com

Дерюшева Евгения Игоревна, к.ф.-м.н., Институт биологического приборостроения ФГБУН ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований» РАН;

e-mail: evgenia.deryusheva@gmail.com

Evgeniya I. Deryusheva, Cand. Sci. (Phys.-Math.), Institute for Biological Instrumentation, Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences;

e-mail: evgenia.deryusheva@gmail.com

Немашкалова Екатерина Леонидовна, к.б.н., Институт биологического приборостроения ФГБУН ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований» РАН;

e-mail: elnemashkalova@gmail.com

Ekaterina L. Nemashkalova, Cand. Sci. (Biol.), Institute for Biological Instrumentation, Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences;

e-mail: elnemashkalova@gmail.com

Вологжанникова Алиса Андреевна, к.б.н., Институт биологического приборостроения ФГБУН ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований» РАН;

e-mail: lisiks.av@gmail.com

Alisa A. Vologzhannikova, Cand. Sci. (Biol.), Institute for Biological Instrumentation, Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences;

e-mail: lisiks.av@gmail.com

Назипова Алия Анцаровна, Институт биологического приборостроения ФГБУН ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований» РАН;

e-mail: aliya-alex@rambler.ru

Aliya A. Nazipova, Institute for Biological Instrumentation, Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences;

e-mail: aliya-alex@rambler.ru

Литус Екатерина Андреевна*, к.м.н., Институт биологического приборостроения ФГБУН ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований» РАН;

e-mail: ecalitus@gmail.com

Ekaterina A. Litus*, Cand. Sci. (Med.), Institute for Biological Instrumentation, Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences;

e-mail: ecalitus@gmail.com

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ГУМИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ В СОПРОВОДИТЕЛЬНОЙ ТЕРАПИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

Н.С. Бендерский¹, А.В. Сафроненко², Е.В. Ганцгорн^{2,*}, О.М. Куделина², А.В. Мороз²

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России
344037, Российская Федерация, Ростов-на-Дону, ул. 14-я линия, 63

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

В настоящее время сопроводительная терапия является неотъемлемой частью лечения онкологических больных, позволяющей купировать симптомы злокачественных новообразований и нежелательные явления проводимого лечения. Это в значительной степени обуславливает актуальность поиска и разработки новых лекарственных веществ для поддерживающей терапии пациентов с онкопатологией. Одной из наиболее интересных и малоизученных групп природных соединений растительного происхождения являются гуминовые вещества. Представленный обзор направлен на обобщение и систематизацию имеющейся к настоящему времени информации об известных фармакологических эффектах и возможных механизмах действия гуминовых кислот, а также перспективах их применения в сопроводительной терапии онкологических больных.

Ключевые слова: гуминовые вещества, гуминовая кислота, фульвовая кислота, сопроводительная терапия, онкология

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Бендерский Н.С., Сафроненко А.В., Ганцгорн Е.В., Куделина О.М., Мороз А.В. Возможности применения гуминовых веществ в сопроводительной терапии онкологических больных. *Биомедицина*. 2024;20(3E):238–243. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-238-243>

Поступила 15.04.2024

Принята после доработки 18.07.2024

Опубликована 01.11.2024

POTENTIAL OF HUMIC SUBSTANCES IN THE CONCOMITANT THERAPY OF CANCER PATIENTS

Nikita S. Benderskii¹, Andrey V. Safronenko², Elena V. Gantsgorn^{2,*},
Oksana M. Kudelina², Anna V. Moroz²

¹ National Medical Research Centre for Oncology of the Ministry of Health Care of Russia
344037, Russian Federation, Rostov-on-Don, 14th Liniya Str., 63

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

Concomitant therapy is an integral part of modern approaches in treating cancer patients, which allows the symptoms of malignant neoplasms to be mitigated and the adverse events of the treatment to be avoided. Therefore, the search for new drugs for supportive therapy of oncopathology patients seems highly relevant. Humic substances represent a promising, although insufficiently studied, group of natural compounds

of plant origin. This review article is aimed at generalizing and systematizing the information currently available on the known pharmacological effects and possible action mechanisms of humic acids, as well as the prospects for their use in the concomitant therapy of cancer patients.

Keywords: humic substances, humic acid, fulvic acid, concomitant therapy, oncology

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

For citation: Benderskii N.S., Safronenko A.V., Gantsgorn E.V., Kudelina O.M., Moroz A.V. Potential of Humic Substances in the Concomitant Therapy of Cancer Patients. *Journal Biomed.* 2024;20(3E):238–243. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-238-243>

Submitted 15.04.2024

Revised 18.07.2024

Published 01.11.2024

Введение

Несмотря на значительные достижения в области диагностики и лечения, злокачественные новообразования (ЗНО) остаются одной из наиболее значимых причин снижения качества жизни, инвалидизации и смертности населения. Ежегодно в мире выявляется более 19 млн новых случаев ЗНО. По прогнозам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), ожидается, что к 2040 г. онкологическая заболеваемость во всём мире увеличится до 28 млн новых случаев, при этом наибольшее увеличение распространенности ЗНО будет наблюдаться в развивающихся странах [10].

В настоящее время для лечения онкологических заболеваний используют «классическую» триаду методов, включающую оперативное лечение, химио- и лучевую терапию. Однако альтернирующий характер основного противоопухолевого лечения как на патологические, так и, зачастую, на здоровые ткани обуславливает важность качественной сопроводительной терапии у пациентов с ЗНО. Её адекватное выполнение по объёму и качеству согласно современным международным стандартам способствует повышению качества и продолжительности жизни пациентов. В отдельных случаях успех лечения напрямую зависит от проведения сопроводительного лечения. Это в значительной степени обуславливает актуальность поиска и разработки новых лекарственных

веществ для поддерживающей терапии пациентов с онкопатологией. В этом аспекте определённый интерес представляют природные соединения и их производные, обладающие широким спектром использования наряду с благоприятным профилем безопасности. Одной из наиболее интересных и малоизученных групп природных соединений растительного происхождения являются гуминовые вещества.

Методология поиска источников

Был проведён поиск публикаций с использованием комбинаций ключевых слов и логического оператора SQL: (“antioxidant properties” OR “radioprotective properties” OR “prebiotic properties” OR “antitumor”) AND (“humic substances” OR “humic acid” OR “fulvic acid” OR “hymatomelanin acid”) за период с 1990 по 2023 гг. Таким образом, на основании данных о хронологии публикаций, актуальности содержащейся в них информации в настоящий обзор было включено 7 наиболее релевантных отечественных и зарубежных научно-исследовательских работ, в которых обсуждаются фундаментальные, прикладные и клинические аспекты применения гумусовых кислот.

Антиоксидантные свойства

Многочисленные исследования указывают на то, что гуминовые вещества (ГВ) обладают антиоксидантными свойствами. Это обусловлено наличием легкоподвижных атомов водорода (H^+) фенольных гидроксидов, способных нейтрализовывать

свободные радикалы, а также свойством хиноидных группировок инициировать процесс электровосстановления кислорода [1]. Также за счёт сильно делокализованной молекулярной орбитали ГВ могут выступать в роли ловушек для свободных радикалов, что подтверждается наличием в их структуре высокой концентрации парамагнитных центров [2].

Данное свойство ГВ подтверждается работой [8], в которой оценивались кардиопротективные свойства фульвой кислоты (ФК) на животной модели кардиотоксичности, вызванной доксорубином (DOX). В ходе исследования крысам Wistar вводили DOX в общей кумулятивной дозе 15 мг/кг, разделённой на 6 введений, в течение 14 дней. ФК вводили соответствующим группам один раз в день, в течение 21 дня, в дозе 100, 200 и 300 мг/кг соответственно. Затем животных наркотизировали для регистрации частоты сердечных сокращений (ЧСС), систолического (САД) и диастолического (ДАД) артериального давления (путём канюлирования сонной артерии) и забирали кровь для определения уровня лактатдегидрогеназы (ЛДГ), аспартатаминотрансферазы (АСТ) и креатинкиназы МВ (СК-МВ), после чего животных умерщвляли для выделения сердца и приготовления гомогенатов тканей. Антиоксидантный статус оценивался путём измерения уровня малонового диальдегида (МДА), а также активности супероксиддисмутазы (СОД), каталазы и глутатиона.

В результате было установлено, что применение DOX достоверно приводило к снижению ЧСС, САД и ДАД ($p < 0,001$). Это обуславливается способностью DOX влиять на фазу восстановления потенциала действия за счёт нарушения регуляции внутриклеточной концентрации Ca^{2+} . В то же время в группах, получавших ФК, отмечалось значительное увеличение ЧСС и САД, а также незначительное повышение ДАД ($p < 0,05$). Анализ сердечно-сосудистых

маркеров показал, что применение DOX приводило к значительному повышению уровня АСТ, ЛДГ и СК-МВ, что свидетельствовало о повреждении сердечной мышцы ($p < 0,0001$). При этом в группах, получавших ФК, отмечалось значительное снижение данных показателей ($p < 0,001$). При анализе антиоксидантных параметров в группе, получавшей DOX, отмечалось увеличение перекисного окисления липидов, снижение уровня СОД, глутатиона, каталазы и увеличение уровня МДА ($p < 0,0001$). В то же время применение ФК приводило к улучшению эндогенного антиоксидантного потенциала, что характеризовалось увеличением уровня СОД, глутатиона, каталазы и снижением уровня МДА. При гистологическом анализе в группе с применением DOX отмечалась клеточная инфильтрация, некроз, а также изменения гиалина. При этом в группах, получавших ФК, происходило уменьшение миоцитолита и клеточной инфильтрации. Результаты данного исследования свидетельствуют о том, что ФК способна предотвращать свободнорадикальное повреждение сердечных миоцитов и нивелировать патологические изменения, вызванные DOX.

Радиопротекторные и антимутагенные свойства

Несмотря на последние достижения в области лучевой терапии (ЛТ), исследования последних лет свидетельствуют о том, что ЛТ может индуцировать стохастические эффекты, которые могут приводить к появлению радиационно-индуцированного вторичного ЗНО в соседних тканях и органах [5, 6].

Исследования указывают на то, что ГВ могут проявлять антимутагенные и радиопротективные свойства [11]. В работе [9] проводился метафазный анализ хромосомных aberrаций в культивируемых лимфоцитах периферической крови пациентов с раком щитовидной железы, после облучения лимфоцитов *in vitro* цезием-137

в дозе 1 Гр. Гумат натрия в концентрации 10 и 100 мкг/мл добавляли в культуру клеток через 30 ± 15 мин после стимуляции фитогемагглютининов. В результате было выявлено, что ГН в концентрации 10 мкг/мл проявлял большую эффективность, чем в концентрации 100 мкг/мл, при этом снижая среднюю частоту мутаций на 51,88 и 38,77% соответственно. Подобное действие ГВ оказывают за счёт своих адаптогенных свойств, включающих активацию процессов репарации ДНК. Таким образом, выявлен потенциал применения ГВ не только во время ЛТ, но и в условиях техногенных радиационных катастроф, для снижения риска возникновения онкологических заболеваний.

Пребиотические свойства

В настоящее время появляется всё больше данных о потенциальной взаимосвязи токсического влияния противоопухолевых препаратов на микробиом и снижении эффективности терапии, приводящем к негативным последствиям, включая возникновение резистентности к химиотерапевтическим препаратам. С древних времён известно о стимулирующем действии ГВ на развитие микробов в почве, что явилось причиной изучения их влияния на микробиом живых организмов. Гуминовые кислоты (ГК) в основном состоят из ароматического остова, включающего азотистые гетероциклы, окружённые фенольными, карбоксильными и хиноидными функциональными группами, а также широким набором биологически активных соединений, водорастворимых и быстро гидролизующихся фракций. Было установлено, что благодаря полифункциональности групп при низких значениях pH ГК заряжены положительно и могут взаимодействовать с анионами, но при pH выше 4,7 они заряжены отрицательно из-за диссоциации протонов от карбоновых кислот или спиртов и способны реагировать с катионами [3, 12].

В связи с этим в эксперименте с использованием модели, имитирующей три основных отдела желудочно-кишечного тракта курицы *in vitro*, использовались ферментативные условия и различные значения pH (1,2–2; 5,2 и 6,4–6,8), в которых оценивали влияние ГК на количество важных для домашних птиц бактерий, таких как *S. enteritidis*, *E. coli*, *Cl. perfringens*, *L. salivarius* и *B. subtilis*. В ходе исследования было выяснено, что добавление ГК достоверно приводило к увеличению количества *S. enteritidis*, *E. coli*, *Cl. perfringens* и *B. subtilis*. При этом в преджелудке количество бактерий было снижено по сравнению с наблюдаемым в кишечнике, что объясняется низким уровнем pH, являющимся важным фактором для роста бактерий. ГК, являясь амфифильными веществами, проявляют большую эффективность при низком pH и способствуют абсорбции на различных поверхностях, в т. ч. и на биологических мембранах бактерий [4, 11].

Таким образом, стимулирующее действие ГВ на микробиоту толстой кишки повышает интерес к данной группе веществ, особенно если взять их за основу для разработки специфических препаратов, применяемых с целью повышения эффективности химиотерапии онкологических больных.

Заключение

Накопленный объём исследований подтверждает многообразие эффектов гуминовых веществ, что объясняется не только составом их периферических цепей и функциональных групп, но и особенностями строения конденсированных ароматических ядер. Приведённые данные свидетельствуют о том, что они обладают выраженными антиоксидантными и радиопротективными свойствами, а также могут оказывать положительное влияние на микрофлору, демонстрируя пребиотические

свойства. Выявленный спектр фармакологических эффектов в будущем может позволить дополнить существующие методы

сопроводительной терапии онкологических больных, повысив их эффективность, или разработать новые подходы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Зыкова М.В., Логвинова Л.А., Кривошеков С.В., Воронова О.А., Ласукова Т.В., Братишко К.А., Жолобова Г.А., Голубина О.А., Передерина И.А., Дрыгунова Л.А., Тверякова Е.Н., Белоусов М.В. Антиоксидантная активность высокомолекулярных соединений гуминовой природы. *Химия растительного сырья*. 2018;3:239–250. [Zykova M.V., Logvinova L.A., Krivoshechekov S.V., Voronova O.A., Lasukova T.V., Bratishko K.A., Zholobova G.A., Golubina O.A., Perederina I.A., Drygunova L.A., Tveryakova E.N., Belousov M.V. Antioksidantnaya aktivnost' vysokomolekulyarnykh soedineniy guminovoy prirody [Antioxidant activity of macromolecular compounds of humic etiology]. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya* [Chemistry of Plant Raw Material]. 2018;3:239–250. (In Russian)].
2. Лодыгин Е.Д., Безносиков В.А., Чуков С.Н. Парамагнитные свойства гумусовых кислот подзолистых и болотно-подзолистых почв. *Почвоведение*. 2007;7:807–810. [Lodygin E.D., Beznosikov V.A., Chukov S.N. Paramagnitnye svoystva gumusovykh kislot podzolistykh i bolotno-podzolistykh pochv [Paramagnetic properties of humic acids of podzolic and bog-podzolic soils]. *Pochvovedenie* [Eurasian Soil Science]. 2007;7:807–810. (In Russian)].
3. Kinniburgh D.G., Van Riemsdijk W.H., Koopal L.K., Benedetti M.F. Chapter 23 — Ion binding to humic substances: Measurements, models, and mechanisms. In: *Adsorption of metals by geomedia. Variables, mechanisms, and model applications*. Washington: Academic Press, 1998:483–520.
4. Latorre J.D., Hernandez-Velasco X., Kuttappan V.A., Wolfenden R.E., Vicente J.L., Wolfenden A.D., Bielke L.R., Prado-Rebolledo O.F., Morales E., Hargis B.M., Tellez G. Selection of *Bacillus* spp. for cellulase and xylanase production as direct-fed microbials to reduce digesta viscosity and *Clostridium perfringens* proliferation using an in vitro digestive model in different poultry diets. *Front. Vet. Sc.* 2015;2:25. DOI: 10.3389/fvets.2015.00025
5. Marcu L.G. Photons — radiobiological issues related to the risk of second malignancies. *Phys. Med.* 2017;42:213–220. DOI: 10.1016/j.ejmp.2017.02.013
6. Martling A., Smedby K.E., Birgisson H., Olsson H., Granath F., Ekblom A., Glimelius B. Risk of second primary cancer in patients treated with radiotherapy for rectal cancer. *Br. J. Surg.* 2017;104(3):278–287. DOI: 10.1002/bjs.10327
7. Muslumova Z.H., Mammadli S.A., Farajov M.F. Study of radioprotective properties of potassium humate in gamma irradiated wheat seedlings. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*. 2022;18(3):53–59.
8. Shikalgar T.S., Naikwade N.S. Cardioprotective effect of fulvic acid on doxorubicin induced cardiac oxidative stress in rats. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 2018;9(8):3264–3273.
9. Shkarupa M., Klymenko S.V. Radioprotective properties of sodium humate in radiation-induced mutagenesis in cultured lymphocytes of thyroid cancer patients. *Exp. Oncol.* 2016;38(2):108–111.
10. Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., Bray F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* 2021;71(3):209–249. DOI: 10.3322/caac.21660
11. Wu Q., Guthrie M.J., Jin Q. Physiological acclimation extrapolates the kinetics and thermodynamics of methanogenesis from laboratory experiments to natural environments. *Front. Ecol. Evol.* 2022;10:838487. DOI: 10.3389/fevo.2022.838487
12. Zerehsaz Y., Shao C., Jin J. Tool wear monitoring in ultrasonic welding using high-order decomposition. *Journal of Intelligent Manufacturing*. 2019;30:657–669. DOI: 10.1007/s10845-016-1272-4

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Бендерский Никита Сергеевич, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России;
e-mail: cornance@yandex.ru

Nikita S. Benderskii, National Medical Research Centre for Oncology of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: cornance@yandex.ru

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

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

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

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

Куделина Оксана Михайловна, к.м.н., ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России;
e-mail: kuomi81@mail.ru

Oksana M. Kudelina, Cand. Sci. (Med.), Rostov State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: kuomi81@mail.ru

Мороз Анна Викторовна, ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России;
e-mail: anamoroz908@gmail.com

Anna V. Moroz, Rostov State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: anamoroz908@gmail.com

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

<https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-244-247>



ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПОРАЖЕНИЯ ПЕЧЕНИ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ ЦЕФАЛОСПОРИНОВ

И.В. Замлелая*, А.В. Сафроненко, Н.В. Сухорукова, А.В. Каплиев,
А.В. Криштопа, С.С. Хрхрян

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

На протяжении многих лет цефалоспорины редко упоминались как лекарственные средства, вызывающие гепатотоксичность. Однако к настоящему времени накоплены данные, подтверждающие возможное развитие различных типов лекарственного поражения печени на фоне приёма цефалоспоринов, в т. ч. и отдалённых, проявляющихся через 1–3 недели после однократного введения.

Ключевые слова: цефалоспорины, лекарственное поражение печени, гепатотоксичность

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Замлелая И.В., Сафроненко А.В., Сухорукова Н.В., Каплиев А.В., Криштопа А.В., Хрхрян С.С. Лекарственные поражения печени при применении цефалоспоринов. *Биомедицина*. 2024;20(3E):244–247. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-244-247>

Поступила 15.04.2024

Принята после доработки 18.07.2024

Опубликована 01.11.2024

DRUG-INDUCED LIVER DAMAGE WHEN USING CEPHALOSPORINS

Irina V. Zamlelaya*, Andrey V. Safronenko, Natalya V. Sukhorukova, Andrey V. Kapliev,
Anna V. Krishtopa, Sofia S. Khrkhrian

Rostov State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia
344022, Russian Federation, Rostov-on-Don, Nakhichevansky Lane, 29

For many years, cephalosporins have been rarely reported as drugs causing hepatotoxicity. However, the recent data points to the possible development of various types of drug-induced liver damage associated with cephalosporins, including long-term ones, which manifest themselves 1–3 weeks after a single administration.

Keywords: cephalosporins, drug-induced liver damage, hepatotoxicity

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

For citation: Zamlelaya I.V., Safronenko A.V., Sukhorukova N.V., Kapliev A.V., Krishtopa A.V., Khrkhrian S.S. Drug-Induced Liver Damage when Using Cephalosporins. *Journal Biomed*. 2024;20(3E):244–247. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-244-247>

Submitted 15.04.2024

Revised 18.07.2024

Published 01.11.2024

Лекарственное поражение печени (ЛПП) является основной причиной заболеваемости и смертности, а также основной причиной изъятия антибиотиков с рынка и снятия с производства [6]. Антимикробные препараты возглавляют список этиологических факторов ЛПП, несмотря на то что серьёзная гепатотоксичность, вызванная антибиотиками, невелика по сравнению с ежегодным их использованием [1].

Что касается цефалоспоринов, то в литературе описаны редкие случаи гепатобилиарных нарушений [2]. Среди них в основном холестаз на фоне приёма цефтриаксона, который может вызвать образование камней в желчном пузыре.

Цефалоспорины считаются одной из безопасных групп препаратов. Так ли это? Что изменилось за последние годы? Данный вопрос вызывает особый интерес, т. к. средний интервал между годом запуска препарата и годом, в котором впервые было зарегистрировано нежелательное явление, составляет 4–8 лет [6]. Поэтому могут появиться новые данные, которые способны изменить наше отношение к безопасности данной группы.

В исследовании в VigiBase [7] было проанализировано 1343 сообщения о безопасности и 1585 случаев побочных реакций на цефалоспорины второго поколения. Нарушение функции печени было наиболее частой нежелательной лекарственной реакцией (НЛР), за ним следовали желтуха и гепатит. Для 49% НЛР, зарегистрированных у пожилых людей, и 51% у взрослого населения, исход был благоприятным, летальный исход был отмечен у 2% взрослых и 10% пожилых людей.

Выявлена общая тенденция увеличения спонтанных сообщений НЛР гепатобилиарной системы при применении цефалоспоринов второго поколения (рис.) в период с 1980 по 2018 гг. Она не постоянная, с несколькими пиками, самый высокий из которых пришёлся на 2014 г.

Более высокие значения пропорционального коэффициента отчётности были зарегистрированы у пожилых людей при цефотетан-ассоциированной желтухе, цефуроксим-ассоциированном остром гепатите и холестатическом гепатите, а также при цефотиам- и цефметазол-ассоциированном заболевании печени.

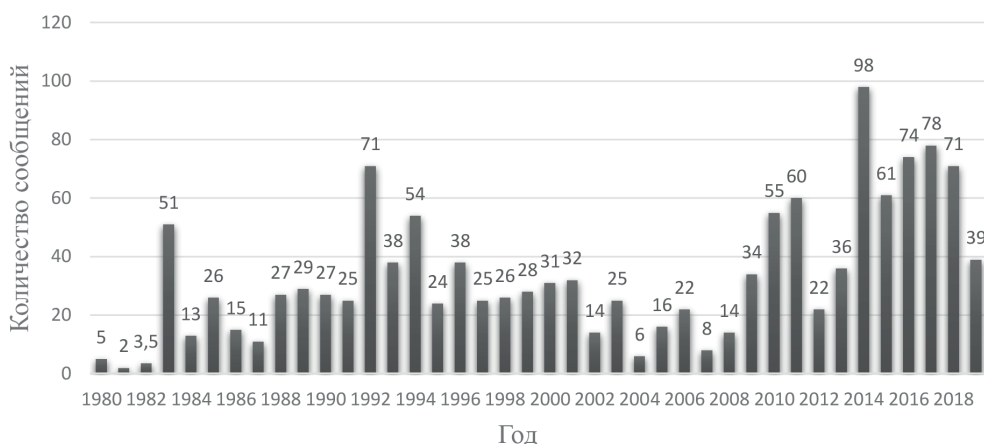


Рис. Количество спонтанных сообщений НЛР гепатобилиарной системы при применении цефалоспоринов второго поколения [7].

Fig. Number of spontaneous reports of adverse drug reactions in the hepatobiliary system associated with the use of second generation cephalosporins [7].

В работе [5] в анализ ЛПП включили 471 пациента, получавшего цефтриаксон. Высокую дозу антибиотика назначали в 7,9% случаев, тогда как остальные 92,1% получили обычную дозу. У 16,2% пациентов, получавших высокие дозы цефтриаксона, наблюдалось повреждение печени. Настоящее исследование показало, что высокие дозы цефтриаксона были связаны со значительно более высокой частотой повреждения печени по сравнению с режимом нормальной дозы.

В ретроспективном когортном исследовании, включившем 634 пациента, анализировалась связь применения цефтриаксона с частотой ЛПП у всех пациентов, поступивших с января по декабрь 2019 г. в больницу общего профиля Хазм Мебайрик (Доха, Катар) по поводу распространённых заболеваний, которые требовали терапии данным антибиотиком по клиническим показаниям [4]. Повреждения печени у пациентов, получавших цефтриаксон, наблюдались в 19,71%, что значительно выше, чем описано в литературе (2,9–13,9%). При этом высокие дозы использованы были только у 2,2% пациентов. Возможно, различия данных с описанными в литературе связаны с использованием цефтриаксона вместе с другими лекарствами, которые метаболизируются в печени.

Проспективное многоцентровое исследование DILIN [5], включавшее 1212 пациентов, выявило 19 случаев повреждения печени через 1–3 недели после однократной инфузии цефазолина, вводимого профилак-

тически во время операции. Отклонения лабораторных анализов отражали холестатическое или смешанное холестатическое/гепатоцеллюлярное повреждение [4], возможная причина которого — иммуноаллергическая реакция на структурный компонент 4-кольцевой молекулы β -лактама.

Выявлены НЛР на другие цефалоспорины (цефалексин, цефадроксил, цефуроксим, цефаклор, цефтриаксон, цефдинир, цефотаксим, цефепим). Они были связаны с более тяжёлым течением повреждений, включая 2 случая смерти от печёночной недостаточности. Большинству (64%) пациентов потребовалась госпитализация, а уровень смертности составил 14%.

В исследованиях описывают холестатический [3, 5, 7], гепатоцеллюлярный [8] и смешанный [3, 5, 7] тип ЛПП при применении цефалоспоринов.

Заключение

Лекарственные поражения печени на фоне применения цефалоспоринов встречаются чаще, чем предполагалось ранее. Нежелательные лекарственные реакции могут быть как немедленные, проявляющиеся в период использования препаратов, так и отдалённые, возникающие через 1–3 недели после отмены. Тип повреждения печени зарегистрирован не только холестатический, но гепатоцеллюлярный и смешанный. Это требует более тщательного врачебного наблюдения за признаками поражения печени во время и после применения цефалоспоринов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Ихамбаева А.Н., Макалкина Л.Г., Алдиярова Н.Т., Суров В.К. Безопасность применения антибактериальных средств в педиатрии. *Нейрохирургия и неврология Казахстана*. 2019;4(57):48–65. [Ikhambaeva A.N., Makalkina L.G., Aldiyarova N.T., Surov V.K. Bezopasnost' primeneniya antibakterial'nykh sredstv v pediatrii [Safety of antibacterial agents in pediatrics]. *Neyrokhirurgiya i nevrologiya Kazakhstana* [Neurosurgery and Neurology of Kazakhstan]. 2019;4(57):48–65. (In Russian)].
2. Переверзев А.П., Остроумова О.Д., Кочетков А.И. Холестатический вариант лекарственно-индуцированного поражения печени. *Качественная клиническая практика*. 2020;3:61–74. [Pereverzev A.P., Ostroumova O.D., Kochetkov A.I. Kholestaticheskiy variant lekarstvenno-indutsirovannogo porazheniya pecheni [Drug-induced liver damage with cholestasis]. *Kachestvennaya klinicheskaya praktika* [Good Clinical Practice]. 2020;3:61–74. (In Russian)]. DOI: 10.37489/2588-0519-2020-3-61-74

3. Alqahtani S.A., Kleiner D.E., Ghabril M., Gu J., Hoofnagle J.H., Rockey D.C.; Drug-Induced Liver Injury Network (DILIN) Study Investigators. Identification and characterization of cefazolin-induced liver injury. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2015;13(7):1328–1336.e2. DOI: 10.1016/j.cgh.2014.11.036
4. Barman M., Al Hariri B., Rahman Mustafa A., Ambra N., Amjed I., Eid Nazzal Alharafsheh A., Illahi M.N., Hamuda S., Gaafar M., Sharif M. Ceftriaxone-induced hepatotoxicity in patients with common medical infections in Qatar: A retrospective study. *Qatar Med. J.* 2022;2022(3):27. DOI: 10.5339/qmj.2022.27
5. Nakaharai K., Sakamoto Y., Yaita K., Yoshimura Y., Igarashi S., Tachikawa N. Drug-induced liver injury associated with high-dose ceftriaxone: A retrospective cohort study adjusted for the propensity score. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 2016;72(8):1003–1011. DOI: 10.1007/s00228-016-2064-7
6. Onakpoya I.J., Heneghan C.J., Aronson J.K. Post-marketing withdrawal of 462 medicinal products because of adverse drug reactions: A systematic review of the world literature. *BMC Med.* 2016;14:10. DOI: 10.1186/s12916-016-0553-2
7. Sipos M., Farcas A., Leucuta D.C., Bucsa C., Huruba M., Mogosan C. Second-generation cephalosporins-associated drug-induced liver disease: A study in VigiBase with a focus on the elderly. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021;14(5):441. DOI: 10.3390/ph14050441
8. Shah T., Joslyn J.A., Lai J. Ceftazidime induced liver injury. *BMJ Case Rep.* 2021;14(12):e246571. DOI: 10.1136/bcr-2021-246571

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Замлелая Ирина Викторовна*, к.м.н., ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России;
e-mail: zamlelaya_irina@rambler.ru

Irina V. Zamlelaya*, Cand. Sci. (Med.), Rostov State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: zamlelaya_irina@rambler.ru

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

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

Сухорукова Наталия Владимировна, к.м.н., доц., ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России;
e-mail: natasuh77@mail.ru

Natalya V. Sukhorukova, Cand. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Rostov State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: natasuh77@mail.ru

Каплиев Андрей Викторович, к.м.н., доц., ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России;
e-mail: kapandr81@yandex.ru

Andrey V. Kapliev, Cand. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Rostov State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: kapandr81@yandex.ru

Криштопа Анна Викторовна, к.м.н., ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России;
e-mail: miss.annakrishtopa11@yandex

Anna V. Krishtopa, Cand. Sci. (Med.), Rostov State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: miss.annakrishtopa11@yandex

Хрхрян София Саркисовна, ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России;
e-mail: Bsofia158@gmail.com

Sofia S. Khorkhrian, Rostov State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: Bsofia158@gmail.com

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ПОЛИМОРФНОГО МАРКЁРА A1166C ГЕНА РЕЦЕПТОРА К АНГИОТЕНЗИНУ II 1-ГО ТИПА (*AGTR1*) НА ДИНАМИКУ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СУТОЧНОГО МОНИТОРИРОВАНИЯ АРТЕРИАЛЬНОГО ДАВЛЕНИЯ У ПАЦИЕНТОВ С АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ 1–2-Й СТЕПЕНИ

Е.В. Реброва*, Е.В. Ших

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

Различия в ответе на фармакотерапию блокаторами рецепторов ангиотензина II типа могут определяться полиморфизмами в генах, ответственных за их мишень действия. Цель работы: изучить фармакодинамические показатели суточного мониторирования артериального давления (СМАД) эффективности терапии блокаторами рецепторов ангиотензина II в виде монотерапии и в составе комбинированных препаратов у пациентов с артериальной гипертензией в зависимости от генетических особенностей пациентов — полиморфизма A1166C гена рецептора к ангиотензину II 1-го типа (*AGTR1*). В исследование включено 179 пациентов Московского региона с впервые выявленной артериальной гипертензией 1–2-й степени, среди которых 141 (78,8%) женщина и 38 (21,2%) мужчин в возрасте от 32 до 69 лет, которые были случайным образом распределены по группам ирбесартана и валсартана в виде моно- или комбинированной терапии с гидрохлортиазидом методом простой рандомизации. Через 3 недели фармакотерапии определяли наличие генетического полиморфизма rs5186 (A1166C) гена *AGTR1*. СМАД проводили при включении пациентов в исследование и через 3 мес. терапии. Максимальный антигипертензивный эффект по уровню снижения среднего дневного систолического артериального давления (САД) и диастолического артериального давления (ДАД), среднего ночного САД, вариабельности ночного САД и ДАД определялся у гетерозигот А/С в группе пациентов, принимающих валсартан через 3 мес. назначенной фармакотерапии блокаторами рецептора ангиотензина II. Среди пациентов, получавших ирбесартан, статистически значимой ассоциации генотипа полиморфизма A1166C гена *AGTR1* с данными показателями выявлено не было. У гетерозигот отмечено статистически значимо более выраженное снижение средней ночной частоты сердечных сокращений (ЧСС) в группе пациентов валсартана, в то время как снижение средней дневной ЧСС значительно определялось у гомозигот С/С как в группе пациентов ирбесартана, так и валсартана. Таким образом, при персонализации терапии у пациентов с впервые выявленной артериальной гипертензией 1–2-й степени с помощью детекции генетического полиморфизма A1166C гена *AGTR1* пациентам Московского региона, носителям А/С генотипа, целесообразно рекомендовать в качестве более эффективной стартовой терапии блокаторами рецепторов ангиотензина II типа валсартан в виде моно- или комбинированной терапии в зависимости от группы риска.

Ключевые слова: артериальная гипертензия, ген рецептора к ангиотензину II 1-го типа, *AGTR1*, полиморфизм A1166C, ирбесартан, валсартан

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Реброва Е.В., Ших Е.В. Оценка влияния полиморфного маркёра A1166C гена рецептора к ангиотензину II 1-го типа (*AGTR1*) на динамику показателей суточного мониторирования артериального давления у пациентов с артериальной гипертензией 1–2-й степени. *Биомедицина*. 2024;20(3Е):248–258. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-248-258>

Поступила 01.08.2024

Принята после доработки 26.08.2024

Опубликована 01.11.2024

ASSESSMENT OF THE EFFECT OF A1166C POLYMORPHIC MARKER OF ANGIOTENSIN II TYPE 1 RECEPTOR GENE (*AGTR1*) ON THE DYNAMICS OF DAILY BLOOD PRESSURE IN PATIENTS WITH STAGE 1–2 ARTERIAL HYPERTENSION

Ekaterina V. Rebrova*, Evgeniya V. Shikh

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

Differences in the response to pharmacotherapy with angiotensin II receptor blockers may be determined by polymorphisms in the genes responsible for their target of action. In this work, we investigate the pharmacodynamic parameters of daily blood pressure monitoring (DBPM) to assess the efficacy of therapy with angiotensin II receptor blockers in the form of monotherapy and as part of combination therapy in patients with arterial hypertension, depending on their genetic characteristics, i.e., polymorphism A1166C of the angiotensin II type 1 receptor gene (*AGTR1*). The study included 179 patients in the Moscow Oblast with newly diagnosed arterial hypertension of 1–2 stages. Among them, 141 (78.8%) were women and 38 (21.2%) were men aged 32 to 69 years, randomly assigned to irbesartan and valsartan groups in the form of mono- or combination therapy with hydrochlorothiazide by a simple randomization method. Following three weeks of pharmacotherapy, the presence of the rs5186 (A1166C) genetic polymorphism of *AGTR1* gene was determined. DBPM was performed when patients were included in the study and after three months of therapy. The maximum antihypertensive effect was observed in heterozygotes A/C in the group of patients taking valsartan after three months of prescribed angiotensin II receptor blockers pharmacotherapy. This effect was manifested in a decreased average daily systolic blood pressure (SBP) and diastolic blood pressure (DBD), average night SBP, variability of night SBP and DBP. Among patients treated with irbesartan, there was no statistically significant association of the A1166C polymorphism genotype of the *AGTR1* gene with these indicators. Heterozygotes showed a statistically significantly more pronounced decrease in the average sleeping heart rate in the group of valsartan patients. At the same time, the average daily heart rate decreased more significantly in C/C homozygotes in both the group of irbesartan and valsartan patients. Thus, when developing personalized treatment plans for patients with newly diagnosed stage 1–2 arterial hypertension using detection of the A1166C genetic polymorphism of the *AGTR1* gene, it is advisable to recommend valsartan as a more effective initial therapy with angiotensin II receptor blockers in the form of mono- or combination therapy depending on the risk group for patients in the Moscow Oblast who are carriers of the A/C genotype.

Keywords: arterial hypertension, type 1 angiotensin II receptor gene, *AGTR1*, polymorphism A1166C, irbesartan, valsartan

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

For citation: Rebrova E.V., Shikh E.V. Assessment of the Effect of A1166C Polymorphic Marker of Angiotensin II Type 1 Receptor Gene (*AGTR1*) on the Dynamics of Daily Blood Pressure in Patients with Stage 1–2 Arterial Hypertension. *Journal Biomed.* 2024;20(3E):248–258. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-248-258>

Submitted 01.08.2024

Revised 26.08.2024

Published 01.11.2024

Введение

Смертность населения, к которой приводит артериальная гипертензия (АГ), по-прежнему остаётся на высоком уровне, а отсутствие фармакодинамического ответа или его недостаточная эффективность на назначенную антигипертензивную терапию, несмотря на количество доступных терапевтических мишеней, — распространённой проблемой [4, 5, 7, 12]. Ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента и блокаторы рецептора ангиотензина II являются основными классами препаратов, рекомендуемых в качестве терапии первой линии при лечении АГ у взрослых [1]. В настоящее время многочисленные исследования отражают влияние генетических полиморфизмов на вариабельность фармакодинамического ответа на фармакотерапию, а дальнейшие исследования, оценивающие межгенные взаимодействия в ответ на антигипертензивные препараты, могут помочь выявить потенциальные генетические предикторы ответа на лекарственную терапию [8, 9, 11].

Многочисленные исследования показали, что частота генотипов А/С и С/С по маркеру A1166C гена *AGTR1* достоверно выше в группах пациентов, страдающих гипертонией, чем в контрольной группе здоровых людей. Опубликованный в 2019 г. метаанализ 45 исследований (11 911 случаев) установил, что С-аллель на 18% повышает риск развития артериальной гипертензии (ОШ=1,18; 95% ДИ: 1,04–1,34; $p=0,013$) [6].

Цель исследования — изучить фармакодинамические показатели суточного мониторинга артериального давления (СМАД) эффективности терапии блокаторами рецепторов ангиотензина II в виде монотерапии и в составе комбинированных препаратов у пациентов с АГ в зависимости от генетических особенностей пациентов — полиморфизма A1166C гена рецептора к ангиотензину II 1-го типа (*AGTR1*).

Материалы и методы

В исследование включено 179 пациентов с впервые выявленной АГ 1–2-й степени, проживающих в Московском регионе. Среди включённых в исследование были 141 (78,8%) женщина и 38 (21,2%) мужчин в возрасте от 32 до 69 лет (средний возраст — $58,2 \pm 6,4$ года, медианный возраст — 60 (57–63) лет). Пациенты соответствовали следующим критериям включения: АГ 1–2-й степени, возраст от 18 до 74 лет, наличие подписанного письменного информированного согласия пациента на участие в исследовании [3].

Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (Протокол № 05-21 от 10.03.2021 г.). Дизайн исследования: открытое рандомизированное контролируемое клиническое исследование. Программа клинико-инструментального обследования пациента включала в себя: сбор жалоб пациента, анамнеза (наличие факторов риска развития АГ, сопутствующие заболевания), физикальный осмотр, биохимический анализ крови, офисное измерение АД, электрокардиографию (ЭКГ) для исключения больных с нарушениями ритма или сопутствующими заболеваниями сердца, Эхо-КГ, суточное мониторирование АД (СМАД). СМАД проводили при включении пациентов в исследование и через 3 мес. терапии, оценивали значения стандартных дневных и ночных показателей СМАД: среднее значение систолического и диастолического артериального давления (САД, ДАД), частота сердечных сокращений (ЧСС), вариабельность САД, ДАД.

Определение генетического полиморфизма rs5186 (A1166C) гена рецептора 1-го типа ангиотензина II (*AGTR1*) проводили с помощью набора реагентов для выявления полиморфизма в геноме человека «SNP-ЭКСПРЕСС» в режиме реального времени производства ООО НПФ «Литех» (Россия).

Статистический анализ и визуализация полученных данных проводились с использованием среды для статистических вычислений R 4.2.3 («R Foundation for Statistical Computing», Австрия). Описательные статистики для качественных переменных представлены в виде числа наблюдений (относительная частота). Для сравнения групп в отношении качественных переменных использовался точный тест Фишера. Для анализа соответствия эмпирического распределения генотипов теоретическому, определяемому равновесием Харди — Вайнберга использовался тест отношения правдоподобия [3].

Результаты исследований

В таблице представлены результаты оценки динамики САД, ДАД и ЧСС в зависимости от генотипа *AGTR1* A1166C.

Статистически значимых различий в отношении эффекта ирбесартана на среднее

дневное САД в зависимости от генотипа *AGTR1* A1166C выявлено не было ($p=0,782$). Среди гетерозигот, получавших валсартан, отмечалось статистически значимо более выраженное снижение дневного САД — в среднем 7 мм рт. ст. (95% ДИ: -10 – -4 мм рт. ст.; $p<0,001$) по сравнению с гомозиготами AA (рис. 1).

Статистически значимых различий в отношении эффекта ирбесартана на среднее дневное ДАД в зависимости от генотипа *AGTR1* A1166C выявлено не было ($p=0,942$). У пациентов с генотипом C/C, получавших валсартан, отмечено статистически значимо менее выраженное снижение ДАД — в среднем на 6 мм рт. ст. (95% ДИ: $0,6$ – $11,4$ мм рт. ст.; $p=0,024$) по сравнению с гомозиготами A/A, а также несколько менее выраженное снижение ДАД — в среднем на 4,2 мм рт. ст. (95% ДИ: $-1,2$ – $9,5$ мм рт. ст.; $p=0,156$) по сравнению с гетерозиготами (рис. 2).

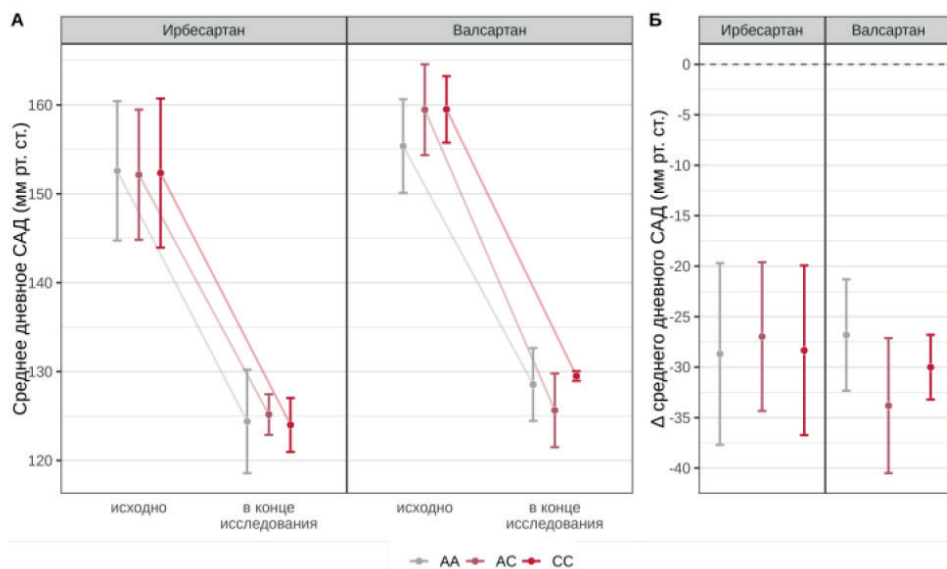


Рис. 1. Сравнительный анализ динамики среднего дневного САД у пациентов с различными генотипами полиморфизма A1166C гена *AGTR1* в группах пациентов ирбесартана и валсартана.

Fig. 1. Comparative analysis of the dynamics of mean daily SBP in patients with different genotypes of the A1166C polymorphism of the *AGTR1* gene in the irbesartan and valsartan patient groups.

Таблица. Показатели САД, ДАД и ЧСС в зависимости от генотипа по полиморфному локусу A1166C гена AGTR1 в группах пациентов, получающих фармакотерапию ирбесартаном/валсартаном
Table. SBP, DBP, and HR values depending on the genotype of the A1166C polymorphic locus of the AGTR1 gene in groups of patients receiving irbesartan/valsartan pharmacotherapy

Характеристика	Ирбесартан				Валсартан			
	AA	AC	CC	p	AA	AC	CC	p
Среднее дневное САД исходно	152,6 (±7,8)	152,1 (±7,3)	152,3 (±8,4)	0,93	155,4 (±5,3)	159,5 (±5,1)	159,5 (±3,7)	<0,001
Среднее дневное САД через 3 мес.	124,4 (±5,8)	125,2 (±2,3)	124 (±3)	0,712	128,5 (±4,1)	125,6 (±4,1)	129,5 (±0,5)	<0,001
Δ среднего дневного САД	-28,7 (±9)	-27 (±7,4)	-28,3 (±8,4)	0,782	-26,8 (±5,5)	-33,8 (±6,7)	-30 (±3,2)	<0,001
Среднее дневное ДАД исходно	100,7 (±5,4)	100,6 (±4,8)	100,2 (±6,4)	0,868	99,4 (±4,5)	100,5 (±3,6)	101,5 (±3,7)	0,326
Среднее дневное ДАД через 3 мес.	70,4 (±3,3)	70,3 (±3,5)	70,3 (±1,9)	0,916	69,4 (±4,4)	72,4 (±3,8)	77,5 (±1,6)	<0,001
Δ среднего дневного ДАД	-30,7 (±6,5)	-30,3 (±5,2)	-29,8 (±6,7)	0,942	-30 (±5,5)	-28,2 (±6,3)	-24 (±5,3)	0,009
Средняя дневная ЧСС исходно	74,2 (±2,6)	74,8 (±2,7)	76,7 (±1,8)	0,048	74 (±3)	74,9 (±0,9)	76,5 (±1,6)	0,011
Средняя дневная ЧСС через 3 мес.	73,2 (±1,4)	73 (±1,7)	72,7 (±1)	0,655	71,9 (±1,9)	72,2 (±2)	72 (±0)	0,738
Δ средней дневной ЧСС	-1,2 (±2,9)	-1,8 (±2,4)	-4 (±1,4)	0,03	-2,1 (±2,3)	-2,7 (±2,5)	-4,5 (±1,6)	0,028
Среднее ночное САД исходно	132,5 (±6,1)	132,1 (±6,6)	133,2 (±6,9)	0,98	132 (±5,6)	137,3 (±4,8)	136 (±6,4)	<0,001
Среднее ночное САД через 3 мес.	115,5 (±6)	115,9 (±3,7)	115,7 (±4,6)	0,957	118,1 (±2,2)	115,3 (±4,3)	119,5 (±0,5)	0,002
Δ среднего ночное САД	-17,3 (±8,4)	-16,2 (±8,1)	-17,5 (±8,4)	0,915	-13,9 (±6)	-22 (±7,2)	-16,5 (±5,9)	<0,001
Среднее ночное ДАД исходно	86 (±4,6)	85,8 (±5)	86,3 (±6,2)	0,862	86 (±4,7)	89,1 (±4,6)	91,5 (±2,7)	0,003
Среднее ночное ДАД через 3 мес.	60,3 (±3,6)	60,6 (±4,1)	62,3 (±4,7)	0,599	59,5 (±3,6)	62 (±4)	69 (±1,1)	<0,001
Δ среднего ночное ДАД	-26 (±5,2)	-25,1 (±5,7)	-24 (±7,8)	0,701	-26,5 (±5,3)	-27,1 (±6,7)	-22,5 (±1,6)	0,114
Средняя ночная ЧСС исходно	68 (±2,5)	68,4 (±3,7)	69,7 (±3,4)	0,238	67,4 (±3,9)	68,7 (±2,4)	70 (±1,1)	0,027
Средняя ночная ЧСС через 3 мес.	65,9 (±3,1)	66,7 (±2,5)	66,8 (±2,1)	0,451	64,5 (±3,5)	62,9 (±2,9)	67 (±2,1)	<0,001
Δ средней ночной ЧСС	-2,2 (±3,6)	-1,7 (±4,3)	-2,8 (±2,5)	0,852	-2,8 (±4,5)	-5,8 (±4,2)	-3 (±1,1)	0,003
Вариабельность дневного САД исходно	17,5 (±3,5)	17,2 (±3,6)	17,5 (±3,6)	0,972	19,9 (±0,4)	19,9 (±0,2)	19,9 (±0,2)	0,827
Вариабельность дневного САД через 3 мес.	11,5 (±0,3)	11,5 (±0,2)	11,6 (±0,2)	0,371	11,6 (±0,2)	11,5 (±0,3)	11,4 (±0,3)	0,093
Δ вариабельности дневного САД	-6,2 (±3,4)	-5,7 (±3,6)	-5,9 (±3,7)	0,902	-8,3 (±0,6)	-8,3 (±0,4)	-8,5 (±0)	0,243
Вариабельность дневного ДАД исходно	12,4 (±2)	12,1 (±1,9)	12,4 (±1,8)	0,702	13,6 (±0,5)	13,4 (±0,7)	14,1 (±0,2)	0,025
Вариабельность дневного ДАД через 3 мес.	9,7 (±0,3)	9,6 (±0,3)	9,6 (±0,2)	0,412	9,8 (±0,3)	9,6 (±0,2)	9,7 (±0)	0,146
Δ вариабельности дневного ДАД	-2,7 (±1,9)	-2,5 (±1,9)	-2,8 (±1,8)	0,801	-3,8 (±0,7)	-3,7 (±0,7)	-4,4 (±0,3)	0,05
Вариабельность ночного САД исходно	11,8 (±1,5)	11,6 (±1,3)	11,6 (±1,4)	0,868	12,2 (±0,7)	12,9 (±0,7)	12,3 (±0)	<0,001
Вариабельность ночного САД через 3 мес.	9,8 (±0,3)	9,8 (±0,4)	9,8 (±0,2)	0,806	9,9 (±0,3)	9,5 (±0,3)	10 (±0,3)	<0,001
Δ вариабельности ночного САД	-2 (±1,5)	-1,8 (±1,3)	-1,9 (±1,6)	0,619	-2,3 (±0,8)	-3,4 (±0,7)	-2,4 (±0,4)	<0,001
Вариабельность ночного ДАД исходно	9,3 (±0,7)	9,2 (±0,6)	9,6 (±0,9)	0,509	9,4 (±0,5)	10 (±0,4)	9,6 (±0,5)	<0,001
Вариабельность ночного ДАД через 3 мес.	8,6 (±0,3)	8,5 (±0,3)	8,5 (±0,2)	0,275	8,5 (±0,2)	8,4 (±0,1)	8,5 (±0,1)	<0,001
Δ вариабельности ночного ДАД	-0,7 (±0,8)	-0,7 (±0,6)	-1,1 (±1)	0,568	-0,9 (±0,6)	-1,6 (±0,3)	-1,1 (±0,6)	<0,001

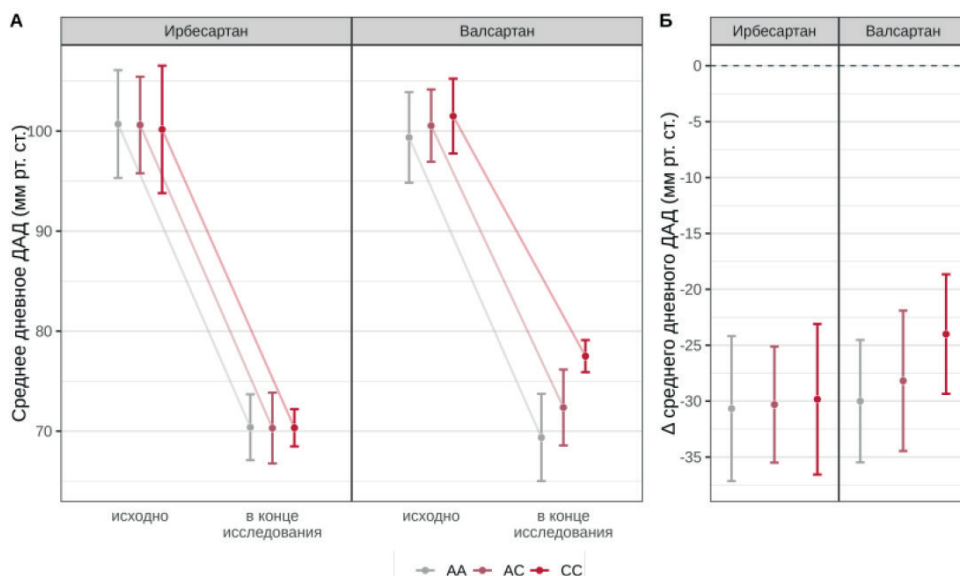


Рис. 2. Сравнительный анализ динамики среднего дневного ДАД у пациентов с различными генотипами полиморфизма A1166C гена *AGTR1* в группах пациентов ирбесартана и валсартана.

Fig. 2. Comparative analysis of the dynamics of mean daily DBP in patients with different genotypes of the A1166C polymorphism of the *AGTR1* gene in the irbesartan and valsartan patient groups.

Как среди пациентов, получавших ирбесартан, так и среди получавших валсартан, пациенты с генотипом С/С имели статистически значимо более выраженное снижение дневной ЧСС — в среднем на 2,8 уд./мин (95% ДИ: $-5,6 \div -0,1$ уд./мин; $p=0,043$) и 2,4 уд./мин (95% ДИ: $-4,6 \div -0,3$ уд./мин; $p=0,024$) соответственно.

Статистически значимых различий в отношении эффекта ирбесартана на среднее ночное САД в зависимости от генотипа *AGTR1* A1166C выявлено не было ($p=0,915$). Среди гетерозигот, получавших валсартан, отмечалось статистически значимо более выраженное снижение ночного САД — в среднем, 8,1 мм рт. ст. (95% ДИ: $-11,4 \div -4,8$ мм рт. ст.; $p<0,001$) по сравнению с гомозиготами АА и на 5,5 мм рт. ст. (95% ДИ: $-11,5 \div -0,5$ мм рт. ст.; $p=0,08$) по сравнению с гомозиготами СС (рис. 3).

Статистически значимой ассоциации изменения среднего ночного ДАД на фоне лечения не было установлено как среди

пациентов, принимающих ирбесартан ($p=0,701$), так и среди пациентов, принимающих валсартан ($p=0,114$).

Статистически значимых различий в отношении эффекта ирбесартана на среднюю ночную ЧСС в зависимости от генотипа *AGTR1* A1166C выявлено не было ($p=0,852$). У гетерозигот, получавших валсартан, отмечено статистически значимо более выраженное снижение ЧСС — в среднем на 3 уд./мин (95% ДИ: $-5,1 \div -0,9$ уд./мин; $p=0,003$) по сравнению с гомозиготами АА и несколько более выраженное снижение ЧСС — в среднем на 2,8 уд./мин (95% ДИ: $-6,7 \div -1$ уд./мин; $p=0,195$) по сравнению с гомозиготами СС.

Нами не было установлено статистически значимой ассоциации вариабельности САД днём с генотипом по локусу *AGTR1* A1166C как среди пациентов, получавших ирбесартан ($p=0,902$), так и среди получавших валсартан ($p=0,243$).

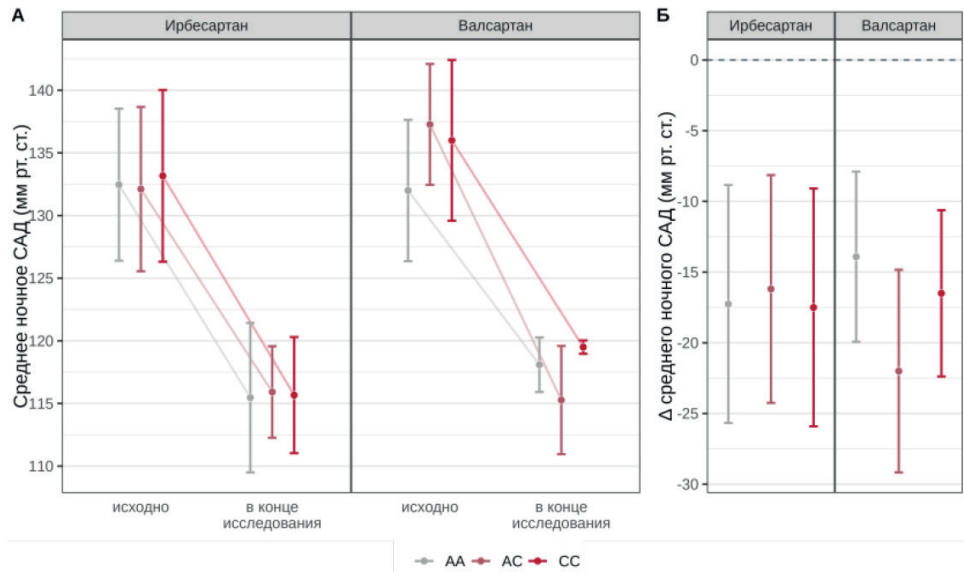


Рис. 3. Сравнительный анализ динамики среднего ночного САД у пациентов с различными генотипами полиморфизма A1166C гена AGTR1 в группах пациентов ирбесартана и валсартана.

Fig. 3. Comparative analysis of the dynamics of mean sleeping SBP in patients with different genotypes of the A1166C polymorphism of the AGTR1 gene in the irbesartan and valsartan patient groups.

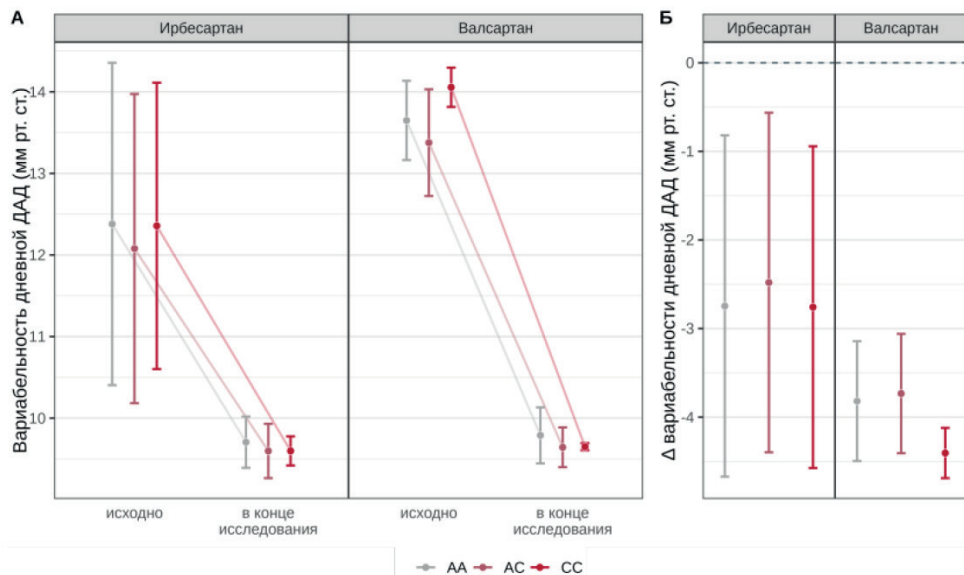


Рис. 4. Сравнительный анализ динамики вариабельности ДАД днём у пациентов с различными генотипами полиморфизма A1166C гена AGTR1 в группах пациентов ирбесартана и валсартана.

Fig. 4. Comparative analysis of the dynamics of daytime DBP variability in patients with different genotypes of the A1166C polymorphism of the AGTR1 gene in the irbesartan and valsartan patient groups.

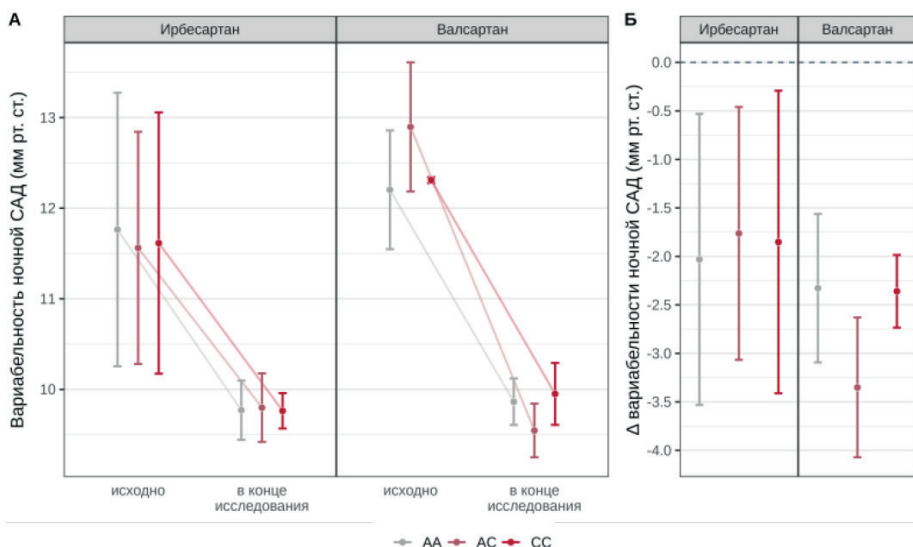


Рис. 5. Сравнительный анализ динамики вариальности САД ночью у пациентов с различными генотипами полиморфизма A1166C гена *AGTR1* в группах пациентов ирбесартана и валсартана.

Fig. 5. Comparative analysis of the dynamics of SBP variability at night in patients with different genotypes of the A1166C polymorphism of the *AGTR1* gene in the irbesartan and valsartan patient groups.

Статистически значимой связи генотипа *AGTR1* A1166C с вариальностью ДАД днём при применении ирбесартана выявлено не было ($p=0,801$), при применении валсартана отмечено статистически более выраженное снижение вариальности у гомозигот CC в среднем на 0,6 мм рт. ст. (95% ДИ: $-1,2 \div -0$ мм рт. ст.; $p=0,061$) по сравнению с гомозиготами AA и в среднем на 0,7 мм рт. ст. (95% ДИ: $-1,3 \div -0,1$ мм рт. ст.; $p=0,024$) по сравнению с гетерозиготами (рис. 4).

Среди пациентов, получавших ирбесартан, не было выявлено статистически значимой ассоциации генотипа *AGTR1* A1166C с вариальностью ночного САД ($p=0,619$). Среди гетерозигот, получавших валсартан, было отмечено статистически значимо более выраженное снижение вариальности ночного САД в среднем на 1 мм рт. ст. (95% ДИ: $-1,4 \div -0,6$ мм рт. ст.; $p<0,001$) по сравнению с гомозиготами AA и на 1 мм рт. ст.

(95% ДИ: $-1,6 \div -0,3$ мм рт. ст.; $p=0,002$) по сравнению с гомозиготами CC (рис. 5).

Среди пациентов, получавших ирбесартан, не было выявлено статистически значимой ассоциации генотипа *AGTR1* A1166C с вариальностью ночного ДАД ($p=0,568$). Среди гетерозигот, получавших валсартан, было отмечено статистически значимо более выраженное снижение вариальности ночного ДАД в среднем на 0,7 мм рт. ст. (95% ДИ: $-1 \div -0,5$ мм рт. ст.; $p<0,001$) по сравнению с гомозиготами AA и на 0,5 мм рт. ст. (95% ДИ: $-0,9 \div -0,1$ мм рт. ст.; $p=0,019$) по сравнению с гомозиготами C/C (рис. 6).

Обсуждение результатов

В литературе представлено ограниченное количество исследований оценки эффективности терапии блокаторами рецептора ангиотензина II в зависимости от генотипа по полиморфизму A1166C гена *AGTR1*, а их результаты остаются противоречивыми.

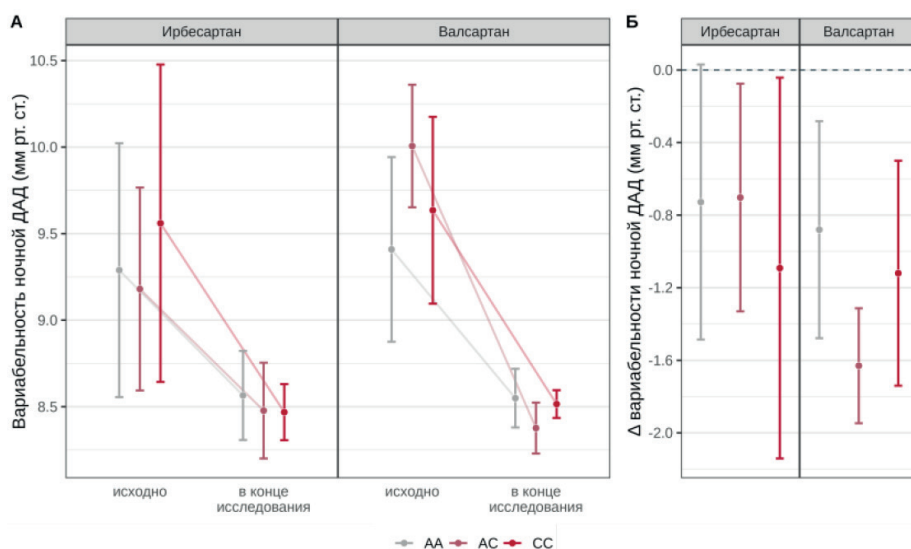


Рис. 6. Сравнительный анализ динамики варибельности ДАД ночью у пациентов с различными генотипами полиморфизма A1166C гена *AGTR1* в группах пациентов ирбесартана и валсартана.

Fig. 6. Comparative analysis of the dynamics of DBP variability at night in patients with different genotypes of the A1166C polymorphism of the *AGTR1* gene in the irbesartan and valsartan patient groups.

Так, авторы работы [10] опубликовали данные ретроспективного исследования, в которое был включён 281 пациент с АГ, получавшие монотерапию валсартаном в течение месяца. Пациенты были разделены на две группы по уровню САД и ДАД при офисном измерении АД: хорошо контролируемая АД (менее 140/90 мм рт. ст.) — 144 пациента; и плохо контролируемая АД (более либо равное 140/90 мм рт. ст.). Авторы определили более высокую частоту встречаемости аллеля С гена *AGTR1* A1166C в группе пациентов с хорошим контролем значений АД ($p=0,005$ и $p=0,006$ соответственно), а генотипы А/С и С/С *AGTR1* A1166C были достоверно связаны с лучшим контролем АГ при лечении валсартаном по сравнению с генотипом А/А (ОШ=2,836; 95% ДИ: 1,199–6,705; $p=0,018$). Полученные нами данные среди населения Московского региона коррелируют с результатами данного исследования.

В исследовании [2] на жителях Горной Шории при изучении влияния A1166C полиморфизма гена *AGTR1* было выявлено, что в когорте шорцев достигали целевого уровня АД обладатели гомозиготного генотипа А/А гена *AGTR1*, при этом пациентам, включённым в исследование (597 человек), были назначены различные группы антигипертензивных препаратов.

В работе [13] изучали влияние A1166C полиморфизма гена *AGTR1* на эффективность терапии лозартаном у пациентов с циррозом печени и портальной гипертензией. Гомозиготы по А аллелю гена *AGTR1* исходно показали более высокое лёгочное и портальное венозное давление, а после назначения фармакотерапии — значимо более выраженное снижение давления в воротной вене по сравнению с пациентами с генотипом А/С и С/С. 10 из 15 пациентов с генотипом А/А ответили на лечение лозартаном, в то время как только один

из восьми пациентов с генотипами A/C и C/C ($p < 0,002$) продемонстрировал снижение портальной гипертензии.

Таким образом, данное исследование посвящено отдельному полиморфизму, ответственному за определённое звено ренин-ангиотензин-альдостероновой системы и оказывающему влияние на риск развития АГ и на эффективность терапии блокаторами рецептора ангиотензина II, в то время как ответ на антигипертензивную терапию также зависит и от генов, которые вовлечены в патогенетические механизмы развития АГ и изменяют фармакодинамические эффекты лекарственных средств, модифицируют механическое взаимодействие между лекарственными средствами и генами, а также от полиморфизмов в генах, связанных с переносчиками лекарственных средств, что определяет необходимость дальнейшего изучения влияния полиморфизмов панели генов-кандидатов.

Выводы

Таким образом, достоверный максимальный антигипертензивный эффект по уровню снижения среднего дневного САД и ДАД, среднего ночного САД, вариабельности ночного САД и ДАД определялся у гетерозигот полиморфизма A1166C гена

AGTR1 в группе пациентов, принимающих валсартан в виде моно- или комбинированной терапии через 3 мес. назначенной фармакотерапии блокаторами рецептора ангиотензина II. Также у гетерозигот отмечено статистически значимо более выраженное снижение средней ночной ЧСС в группе пациентов валсартана, в то время как снижение средней дневной ЧСС значительно определялось у гомозигот C/C как в группе пациентов ирбесартана, так и валсартана. Полученные данные могут свидетельствовать о более стабильном антигипертензивном эффекте у пациентов, гетерозигот генетического полиморфизма A1166C гена AGTR1. Среди пациентов, получавших ирбесартан, статистически значимой ассоциации генотипа полиморфизма A1166C гена AGTR1 с данными показателями выявлено не было. Таким образом, при персонализации терапии у пациентов с впервые выявленной АГ 1–2-й степени с помощью детекции генетического полиморфизма A1166C гена AGTR1, пациентам Московского региона, носителям A/C генотипа, целесообразно рекомендовать в качестве более эффективной стартовой терапии блокаторами рецептора ангиотензина II валсартан в виде моно- или комбинированной терапии в зависимости от группы риска.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Артериальная гипертензия у взрослых. Клиническая рекомендация. Российское кардиологическое общество, 2020. [Arterial'naya gipertenziya u vzroslykh. Klin. rekom. Arterial hypertension in adults. Clinical guidelines]. Rossiyskoe kardiologicheskoe obshchestvo Publ., 2020. (In Russian)].
2. Мулерева Т.А., Морозова Н.И., Максимов В.Н., Огарков М.Ю. Полиморфизм генов-кандидатов ренин-ангиотензин-альдостероновой системы (ACE, AGT, AGTR1) и эффективность лечения артериальной гипертензии. Результаты исследования в Горной Шории. Системные гипертензии. 2020;17(4):49–54. [Mulerova T.A., Morozova N.I., Maksimov V.N., Ogarkov M.Yu. Polimorfizm genov-kandidatov renin-angiotenzin-al'dosteronovoy sistemy (ASE, AGT, AGTR1) i effektivnost' lecheniya arterial'noy gipertenzii. Rezul'taty issledovaniya v Gornoy Shorii [Polymorphism of candidate genes of the renin-angiotensin-aldosterone system (ACE, AGT, AGTR1) and the effectiveness of arterial hypertension treatment. Results of a study in Gornaya Shoria]. Systemic Hypertension. 2020;17(4):49–54. (In Russian)]. DOI: 10.26442/2075082X.2020.4.200034
3. Реброва Е.В., Ших Е.В. Влияние инсерционно-делеционного полиморфизма гена ангиотензин-превращающего фермента на эффективность антигипертензивной терапии блокаторов рецептора ангиотензина II. Фармация и фармакология. 2023;11(6):494–508. [Rebrova E.V., Shikh E.V. Vliyanie insertionno-deletsionnogo polimorfizma gena angiotenzinprevrashchayushchego fermenta na effektivnost' antigipertenzivnoy terapii blokatorov retseptora angiotenzina II [Effect of insertion/deletion polymorphism of angiotensin-converting enzyme

- gene on efficacy of antihypertensive therapy with angiotensin II receptor blockers]. *Pharmacy & Pharmacology*. 2023;11(6):494–508. (In Russian)]. DOI: 10.19163/2307-9266-2023-11-6-494-508
4. Agostini L.D.C., Silva N.N.T., Belo V.A., Luizom M.R., Lima A.A., da Silva GN. Pharmacogenetics of angiotensin-converting enzyme inhibitors (ACEI) and angiotensin II receptor blockers (ARB) in cardiovascular diseases. *Eur. J. Pharmacol.* 2024;981:176907. DOI: 10.1016/j.ejphar.2024.176907
 5. Al-Hussainy H.A., Hassan A.F., Oraibi A.I., Al-Juhaishi A.M.R., Naji F.A., Al-Tameemi Z.S. Clinical pharmacogenetics of angiotensin II receptor blockers in Iraq. *J. Pharm. Bioallied. Sci.* 2023;15(3):101–106. DOI: 10.4103/jpbs.jpbs_313_23
 6. Fajar J.K., Susanti M., Pikir B.S., Saka B.P.N., Sidarta E.P., Tamara F., Akbar R.R., Utama S.A., Gunawan A., Herianshyan T. The association between angiotensin II type 1 receptor A1166C gene polymorphism and the risk of essential hypertension: A meta-analysis. *Egypt J. Med. Genet.* 2019;20:14. DOI: 10.1186/s43042-019-0016-3
 7. Gurunathan U., Roe A., Milligan C., Hay K., Ravichandran G., Chawla G. Preoperative renin-angiotensin system antagonists intake and blood pressure responses during ambulatory surgical procedures: A prospective cohort study. *Anesth. Analg.* 2024;138(4):763–774. DOI: 10.1213/ANE.00000000000006728
 8. Katsukunya J.N., Soko N.D., Naidoo J., Rayner B., Blom D., Sinxadi P., Chimusa E.R., Dandara M., Dzobo K., Jones E., Dandara C. Pharmacogenomics of hypertension in Africa: Paving the way for a pharmacogenetic-based approach for the treatment of hypertension in Africans. *Int. J. Hypertens.* 2023;2023:9919677. DOI: 10.1155/2023/9919677
 9. King J.B., Berchie R.O., Derington C.G., Marcum Z.A., Scharfstein D.O., Greene T.H., Herrick J.S., Jacobs J.A., Zheutlin A.R., Bress A.P., Cohen J.B. New users of angiotensin II receptor blocker-versus angiotensin-converting enzyme inhibitor-based anti-hypertensive medication regimens and cardiovascular disease events: A secondary analysis of ACCORD-BP and SPRINT. *J. Am. Heart Assoc.* 2023;12(17):e030311. DOI: 10.1161/JAHA.123.030311
 10. Liu Y., Kong X., Jiang Y., Zhao M., Gao P., Cong X., Cao Y., Ma L. Association of AGTR1 A1166C and CYP2C9*3 gene polymorphisms with the antihypertensive effect of valsartan. *Int. J. Hypertens.* 2022;2022:7677252. DOI: 10.1155/2022/7677252
 11. Nuotio M.L., Sánez Tähtisalo H., Lahtinen A., Donner K., Fyhrquist F., Perola M., Kontula K.K., Hiltunen T.P. Pharmacoeugenetics of hypertension: Genome-wide methylation analysis of responsiveness to four classes of antihypertensive drugs using a double-blind crossover study design. *Epigenetics.* 2022;17(11):1432–1445. DOI: 10.1080/15592294.2022.2038418
 12. Rysz J., Franczyk B., Rysz-Górzyska M., Gluba-Brzózka A. Pharmacogenomics of hypertension treatment. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(13):4709. DOI: 10.3390/ijms21134709
 13. Sookoian S., Castaño G., García S.I., Viudez P., González C., Pirola C.J. A1166C angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism may predict hemodynamic response to losartan in patients with cirrhosis and portal hypertension. *Am. J. Gastroenterol.* 2005;100(3):636–642. DOI: 10.1111/j.1572-0241.2005.41168.x

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Реброва Екатерина Владиславовна*, к.м.н., доц., ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет);
e-mail: katrina1987@rambler.ru

Ших Евгения Валерьевна, д.м.н., проф., ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет);
e-mail: chih@mail.ru

Ekaterina V. Rebrova*, Cand. Sci. (Med.), Assoc. Prof., I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University);
e-mail: katrina1987@rambler.ru

Evgeniya V. Shikh, Dr. Sci. (Med.), Prof., I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University);
e-mail: chih@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

