

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

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

БИОМЕДИЦИНА

SCIENTIFIC JOURNAL

JOURNAL BIOMED

Том (Vol.) 20
2024

3





ФГБУН НЦБМТ ФМБА России принял участие в качестве одного из экспонентов на общем стенде ФМБА России в Международном военно-техническом форуме «Армия – 2024», проходившем 12–14 августа 2024 года в КВЦ «Парк Патриот» (Московская область, Алабино), а также в Форуме «Здоровое общество – 2024», проходившем 24–25 июля 2024 года в Инновационном научно-технологическом центре МГУ «Воробьевы горы», кластер «Ломоносов» (Москва).

На выставках были представлены собственные разработки Центра – лекарственные препараты «Лейтрагин» и «Мускулив», БАДы «Мيوактив» и «Фламенко», а также высокотехнологичные инновационные электроимпульсные экстракты из сырья растительного и животного происхождения.



ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий
ФМБА России»

БИОМЕДИЦИНА

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Издается с 2005 г.
4 выпуска в год

2024, Том 20, № 3

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. 3

БИОМЕДИЦИНА

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 «БЕАН» 603003, Нижегородская обл., Нижний Новгород, ул. Баррикад, д. 1
Дата выхода в свет:	10.09.2024

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:	BEAN, LLC. 603003, Russian Federation, Nizhny Novgorod Region, Nizhny Novgorod, Barrikad Street, 1
Publication date:	10.09.2024

■ ГЕНЕТИКА И ЭПИГЕНЕТИКА ЖИВОТНЫХ-БИОМОДЕЛЕЙ

**И.А. Помыткин, Н.С. Огнева, Ю.В. Фокин, Н.В. Петрова,
О.В. Алимкина, В.Н. Каркищенко**

Эпигенетические механизмы противовоспалительного действия
опиоидного пептида Лейтрагин: роль сиртуина 1 10

С.В. Орлов, А.А. Агумава, И.Д. Курдюков, П.П. Бельтюков
Опыт генотипирования коллекции макак-резусов по генам класса I
главного комплекса гистосовместимости 21

■ МЕТОДЫ И ТЕХНОЛОГИИ БИОМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

**О.Н. Гайкова, А.А. Козлов, Г.Г. Катрецкая, М.В. Мельникова,
А.С. Мелехова, Ю.О. Соколова, Е.Д. Бажанова**

Морфологические изменения головного мозга при токсическом поражении 28

О.В. Галзитская, А.В. Мачулин, Е.И. Дерюшева

In silico анализ стабильности рибосомного белка S1
из различных штаммов патогенного микроорганизма *Staphylococcus aureus* 32

А.А. Глоба, А.В. Семаков, С.А. Пухов, С.В. Афанасьева, Л.В. Аникина

Снижение кардиотоксичности даунорубицина путём конъюгации
с природными сесквитерпеновыми лактонами 37

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

Физико-биохимические свойства N-ацетилтрансферазы RimL
гипертермофильной бактерии *Thermus thermophilus* 47

■ РЕЛЕВАНТНОЕ И АЛЬТЕРНАТИВНОЕ БИОМОДЕЛИРОВАНИЕ

И.В. Алексеев, И.А. Мирошкина, А.В. Сорокина, И.Б. Цорин, Л.Г. Колик

Оценка влияния доксорубицина на когнитивные нарушения
и микроскопическую картину отдельных структур головного мозга у крыс 52

А.А. Бондаренко

Скрининг агонистов холинорецепторов на экспериментальной модели *Daphnia magna Straus* .58

В.А. Приходько, Т.М. Матузок, С.В. Оковитый

Современные животные модели химиоиндуцированной периферической полинейропатии . 61

■ ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В БИОМЕДИЦИНЕ

Ю.С. Алексеева, Ю.Д. Мельникова, А.Р. Коликова, В.Ц. Болотова, О.М. Спасенкова

Влияние фитоекстрактов живучки туркестанской и спаржи кистевидной
на эффективность аэробно-анаэробного тренировочного режима 66

А.Ю. Гришина, Д.Ю. Ивкин, С.М. Напалкова, О.В. Буюклинская

Функционирование системы обеспечения качества
при изучении фармакологической безопасности этмабена 71

Д.Ю. Ивкин, М.В. Краснова, А.А. Карпов, С.В. Оковитый, А.Н. Куликов Оценка эффективности двойной комбинированной терапии экспериментальной хронической сердечной недостаточности	75
А.Е. Ким, Е.Б. Шустов Метаболическая реакция организма лабораторных крыс на экстремальную гипертермию.	80
Д.С. Кульчановская, А.В. Черномордова, С.В. Оковитый, А.Н. Куликов Экспериментальное моделирование сердечной недостаточности у мышей	84
М.В. Мельникова, Е.Б. Шустов, Е.А. Золотоверхая, Л.Г. Кубарская, А.А. Бондаренко, А.В. Бельская, А.А. Ватаева Профилактические эффекты полипrenoлов из хвои пихты сибирской при воздействии неблагоприятных факторов	89
К.С. Остренко N-карбамоилглутамат профилактирует интоксикацию аммиака у поросят со сниженной функциональной массой печени	94
С.А. Подурар, Н.Е. Горбатова, А.В. Брянцев, Н.В. Станкова, А.С. Тертычный, Г.А. Варев Сравнительное исследование эффективности импульсного и непрерывного 450 нм лазерного излучения на ткани для послойного удаления пигментных невусов	100
Н.С. Тропская, Е.В. Клычникова, Н.В. Боровкова, А.К. Евсеев, И.В. Горончаровская, М.В. Сторожева, Е.Н. Бородин, А.А. Кочетова, Л.С. Бондаренко, Р.К. Баймуратова, Г.И. Джардималиева, К.А. Кыдралиева Исследование <i>in vivo</i> анти/прооксидантной активности металлоорганического координационного полимера, модифицированного оксидами железа и аскорбиновой кислотой	114
С.А. Червонецкий, А.А. Паймулина, Н.О. Селизарова Отличия в постановке модели черепно-мозговой травмы и последующей поведенческой оценке у крыс и мышей	121
■ КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В БИОМЕДИЦИНЕ	
Л.С. Головкин, А.В. Сафроненко, Е.В. Ганцгорн, М. Вехбх, И.М. Маллеев, А.А. Балоян, Р.М. Манвелян, Е.В. Рашкова Аспекты совместного применения антикоагулянтных и гемостатических лекарственных средств при эндопротезировании крупных суставов	125
О.М. Куделина, А.В. Сафроненко, М.Х.-Б. Бураева, М.Х.-Б. Бураева, С.А. Величко, Д.А. Терехова, Н.С. Бендерский, А.А. Толстой Роль альтернативного сплайсинга в онкогенезе	130

■ GENETICS AND EPIGENETICS OF ANIMALS-BIOMODELS**Igor A. Pomytkin, Nastasya S. Ogneva, Yuriy V. Fokin, Nataliya V. Petrova, Oksana V. Alimkina, Vladislav N. Karkischenko**

Epigenetic Mechanisms of the Anti-inflammatory Action of the Opioid Peptide Leutragin: Role of Sirtuin 1 10

Sergey V. Orlov, Aslan A. Agumava, Ivan D. Kurdyukov, Petr P. Beltyukov
Experience of Genotyping of the Class I Major Histocompatibility Complex Genes in a Rhesus Macaques Collection 21**■ METHODS AND TECHNOLOGIES OF BIOMEDICAL RESEARCH****Olga N. Gaikova, Alexander A. Kozlov, Galina G. Katretskaya, Margarita V. Melnikova, Alexandra S. Melekhova, Yulia O. Sokolova, Elena D. Bazhanova**

Morphological Changes in the Brain During Toxic Injury 28

Oxana V. Galzitskaya, Andrey V. Machulin, Evgeniya I. Deryusheva*In silico* Analysis of the Stability of Ribosomal Protein S1 from Various Strains of the Pathogenic Microorganism *Staphylococcus aureus*. 32**Anastasiya A. Globa, Aleksey V. Semakov, Sergey A. Pukhov, Svetlana V. Afanasyeva, Lada V. Anikina**

Reducing the Cardiotoxicity of Daunorubicin by Conjugation with Natural Sesquiterpene Lactones. . 37

Maria V. Trunilina, Alisa A. Vologzhannikova, Timofey A. Kudryashov, Eugene V. Loktyushov, Vyacheslav V. Bykov, Andrey S. Sokolov, Yulia S. LaptevaPhysical and Biochemical Properties of N-Acetyl Transferase RimL of the Hyperthermophilic Bacteria *Thermus thermophilus*. 47**■ RELEVANT AND ALTERNATIVE BIOMODELLING****Ivan V. Alekseev, Irina A. Miroshkina, Aleksandra V. Sorokina, Iosif B. Tsorin, Larisa G. Kolik**

Doxorubicin Effects on Cognitive Impairment and the Microscopic View of Brain Structures in Rats. 52

Anastasiya A. BondarenkoScreening of Cholinoreceptor Agonists in Experimental Model on *Daphnia magna Straus*. 58**Veronika A. Prikhodko, Tatyana M. Matuzok, Sergey V. Okovitiy**

Current Animal Models of Chemotherapy-Induced Peripheral Polyneuropathy 61

■ PRECLINICAL RESEARCH IN BIOMEDICINE**Yuliya S. Alekseeva, Yuliya D. Melnikova, Anastasia R. Kolikova, Vera Ts. Bolotova, Olga M. Spasenkova**Influence of *Ajuga turkestanica* and *Asparagus racemosus* Phytoextracts on the Effectiveness of Aerobic–Anaerobic Training Regime. 66

Anna Yu. Grishina, Dmitry Yu. Ivkin, Svetlana M. Napalkova, Olga V. Buyuklinskaya Quality Assurance System when Studying the Pharmacological Safety of Etmaben	71
Dmitry Yu. Ivkin, Marina V. Krasnova, Andrew A. Karpov, Sergey V. Okovityi, Alexander N. Kulikov Efficacy Assessment of Dual Combined Therapy in Experimental Chronic Heart Failure.	75
Aleksey E. Kim, Evgeniy B. Shustov Metabolic Response of Laboratory Rats to Extreme Hyperthermia	80
Daria S. Kulchanovskaya, Alexandra V. Chernomordova, Sergey V. Okovityi, Aleksandr N. Kulikov Experimental Modeling of Heart Failure in Mice	84
Margarita V. Melnikova, Evgeniy B. Shustov, Ekaterina A. Zolotoverkhaya, Larisa G. Kubarskaya, Anastasiya A. Bondarenko, Alisa V. Belskaya, Alena A. Vataeva Preventive Effects of Polyprenols from the Needles of <i>Abies sibirica</i> under the Influence of Adverse Factors	89
Konstantin S. Ostrenko N-Carbamoyl Glutamate Prevents Ammonia Intoxication in Piglets with Reduced Liver Function .94	
Stanislav A. Podurar, Natalya E. Gorbatova, Alexander V. Bryantsev, Nataliia V. Stankova, Aleksandr S. Tertychnyy, Gennady A. Varev Comparative Study of the Effectiveness of Pulsed and Continuous 450 nm Laser Radiation on Tissue for Layered Removal of Pigmented Nevi	100
Nataliya S. Tropskaya, Elena V. Klychnikova, Natal'ya V. Borovkova, Anatoly K. Evseev, Irina V. Goroncharovskaya, Mayya V. Storozheva, Yevgeniya N. Borodina, Alena A. Kochetova, Lyubov S. Bondarenko, Roza K. Baimuratova, Gulzhian I. Dzhardimalieva, Kamilia A. Kydralieva <i>In vivo</i> Study of the Anti/Prooxidant Activity of a Metal-Organic Coordination Polymer Modified with Iron Oxides and Ascorbic Acid	114
Sergey A. Chervonetsky, Alexandra A. Paimulina, Natalya O. Selizarova Differences in Models of Traumatic Brain Injury and the Subsequent Behavior Assessment in Rats and Mice	121
■ BIOMEDICAL TECHNOLOGIES IN CLINICAL RESEARCH	
Lilia S. Golovko, Andrey V. Safronenko, Elena V. Gantsgorn, Mhammad Wehbh, Ibragim M. Malleev, Artur A. Baloyan, Roland M. Manvelyan, Ekaterina V. Rashkova Aspects of the Combined Use of Anticoagulant and Hemostatic Drugs in Large Joint Endoprosthetics	125
Oksana M. Kudelina, Andrey V. Safronenko, Maret Kh.-B. Buraeva, Malika Kh.-B. Buraeva, Sofia A. Velichko, Diana A. Terekhova, Nikita S. Benderskii, Artem A. Tolstoy Role of Alternative Splicing in Oncogenesis	130

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ ОПИОИДНОГО ПЕПТИДА ЛЕЙТРАГИН: РОЛЬ СИРТУИНА 1

И.А. Помыткин, Н.С. Огнева*, Ю.В. Фокин, Н.В. Петрова, О.В. Алимкина, В.Н. Каркищенко

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

Сиртуин 1 (SIRT1) — гистоновая деацетилаза III класса, играющая ключевую роль в разрешении воспаления через известные эпигенетические механизмы, включающие деацетилирование гистонов и ядерного фактора κB (NF-κB). Деацетилирование снижает транскрипционную активность NF-κB и связанную с этим продукцию провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкин 1β (IL-1β), фактор некроза опухоли альфа (TNF-α) и интерлейкин 6 (IL-6). В настоящей работе впервые показано, что биомоделирование острого воспаления лёгких однократным введением липополисахарида (LPS) вызывает синхронные осцилляции уровней мРНК цитокинов IL-1β, TNF-α, IL-6 и деацетилазы SIRT1 в лёгких, причём максимальные амплитуды осцилляций мРНК цитокинов наблюдаются в интервале от 1,5 до 5 ч, тогда как высокие уровни мРНК SIRT1 наблюдаются до 24 ч, когда осцилляции мРНК цитокинов уже затухают, что согласуется с гипотезой о роли SIRT1 как факторе, действующем в фазе разрешения воспаления. В работе показано, что механизм противовоспалительного действия ингаляционного гексапептида Лейтрагин, агониста δ-опиоидных рецепторов, связан с его способностью повышать экспрессию мРНК SIRT1 и снижать амплитуды осцилляций мРНК IL-1β, TNF-α и IL-6 в лёгких, что в целом ведёт к разрешению воспаления в условиях биомоделирования острого воспаления лёгких.

Ключевые слова: Лейтрагин, сиртуин 1, ядерный фактор κB, цитокины, острое воспаление лёгких
Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУН НЦБМТ ФМБА России по теме «Экспрессия сиртуинов как биомаркер в оценке функциональных состояний лабораторных животных» (шифр: «Сирт-2024»).

Для цитирования: Помыткин И.А., Огнева Н.С., Фокин Ю.В., Петрова Н.В., Алимкина О.В., Каркищенко В.Н. Эпигенетические механизмы противовоспалительного действия опиоидного пептида Лейтрагин: роль сиртуина 1. *Биомедицина*. 2024;20(3):10–20. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-3-10-20>

Поступила 04.04.2024

Принята после доработки 06.08.2024

Опубликована 10.09.2024

EPIGENETIC MECHANISMS OF THE ANTI-INFLAMMATORY ACTION OF THE OPIOID PEPTIDE LEUTRAGIN: ROLE OF SIRTUIN 1

Igor A. Pomytkin, Nastasya S. Ogneva*, Yuriy V. Fokin, Nataliya V. Petrova,
Oksana V. Alimkina, Vladislav 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

Sirtuin 1 (SIRT1) is a class III histone deacetylase that plays a key role in resolving inflammation through known epigenetic mechanisms involving histone and nuclear factor κ B (NF- κ B) deacetylation. Deacetylation reduces the transcriptional activity of NF- κ B and the associated production of pro-inflammatory cytokines such as interleukin 1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interleukin 6 (IL-6). In the present study, we show for the first time that biomodeling of acute lung inflammation by a single injection of lipopolysaccharide (LPS) induces synchronous oscillations of mRNA levels of cytokines IL-1 β , TNF- α , IL-6 and SIRT1 deacetylase in the lungs, the maximum amplitudes of cytokine mRNA oscillations are observed between 1.5 and 5 hours, whereas high levels of SIRT1 mRNA are observed up to 24 hours, when cytokine mRNA oscillations have already faded, which is consistent with the hypothesis about the role of SIRT1 as a factor acting in the phase of inflammation resolution. The study shows that the mechanism of anti-inflammatory action of inhaled hexapeptide Leutragin, a δ -opioid receptor agonist, is related to its ability to increase SIRT1 mRNA expression and decrease the amplitudes of IL-1 β , TNF- α , and IL-6 mRNA oscillations in the lungs, which generally leads to the resolution of inflammation in the conditions of biomodeling of acute lung inflammation.

Keywords: Leutragin, sirtuin 1, nuclear factor κ B, cytokines, acute lung inflammation

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

Funding: the research was carried out within the framework of the state assignment of the Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia on the topic “Sirtuin expression as a biomarker in assessing the functional states of laboratory animals” (code: “Sirt-2024”).

For citation: Pomytkin I.A., Ogneva N.S., Fokin Yu.V., Petrova N.V., Alimkina O.V., Karkischenko V.N. Epigenetic Mechanisms of the Anti-inflammatory Action of the Opioid Peptide Leutragin: Role of Sirtuin 1. *Journal Biomed.* 2024;20(3):10–20. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-3-10-20>

Submitted 04.04.2024

Revised 06.08.2024

Published 10.09.2024

Введение

Сиртуин 1 (SIRT1) — НАД-зависимая гистоновая деацетилаза III класса, отвечает за деацетилирование остатков лизина в составе белковых субстратов, локализованных в ядре [21]. Модулируя степень ацетилирования гистонов H1, H3 и H4 и некоторых факторов транскрипции, SIRT1 играет роль эпигенетического регулятора, способного влиять на экспрессию ряда генов. В некоторых случаях активность SIRT1 выполняет функцию отрицательной обратной связи к действию транскрипционных факторов, ограничивая транскрипцию генов, регулируемых такими факторами, как E2F1 [20], c-MYC [24] и HIF-1 α [7, 14]. Эти факторы инициируют транскрипцию гена *SIRT1*, а экспрессируемый белок SIRT1, в свою очередь, деацетилюет остатки лизинов в их составе, ингибируя тем самым их транскрипционную

активность. Ряд исследований указывает, что экспрессия SIRT1 может выполнять роль отрицательной обратной связи в процессах воспаления, регулируемых транскрипционной активностью ядерного фактора κ B (NF- κ B) [6, 11–13, 16, 19, 23, 25]. Консервативный мотив связывания NF- κ B обнаруживается трижды в пределах последовательности промотора гена *SIRT1* человека [19], причём все мотивы связывания NF- κ B функциональны, и субъединицы RelA и p50 гетеродимера NF- κ B, связываясь с промотором, многократно повышают уровни мРНК *SIRT1* [11]. Отсроченная повышенная экспрессия мРНК *SIRT1* в условиях активации NF- κ B была подтверждена в экспериментах *in vitro* при стимуляции клеток фактором некроза опухоли альфа (TNF- α) и липополисахаридом (LPS) [16, 25], причём было обнаружено, что в этом процессе ключевую роль играет RelA [25].

В свою очередь SIRT1 снижает транскрипционную активность NF-κB, деацетилируя остаток лизина 310 в составе RelA, тем самым ограничивая воспаление [6, 13, 23]. Опираясь на эти факты, авторы работы [12] выдвинули гипотезу, что экспрессия SIRT1 при воспалении играет роль отрицательной обратной связи, ограничивающей воспаление, где NF-κB действует как положительный регулятор транскрипции гена *SIRT1*, а экспрессируемый SIRT1 выполняет роль отрицательного регулятора активности NF-κB [12]. Однако эта гипотеза всё ещё нуждается в экспериментальном подтверждении *in vivo*, тем более что имеются противоречащие этой гипотезе данные о подавлении экспрессии SIRT1 в печени и лейкоцитах мышей на уровне мРНК и белка в первые часы после введения LPS, известного активатора NF-κB [26].

Воспалительный процесс в лёгких является характерной особенностью пневмонии и острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС), смертность от которого может достигать 40% [9, 17]. В биомоделировании острого воспалительного повреждения лёгких достигнуты значительные успехи [8]. Неинфекционное «стерильное» воспаление лёгких индуцируется интратрахеальным введением мышам липополисахарида *E. coli* 055:B5 (LPS) с предварительной сенсibilизацией животных α-галактозилцерамидом (α-GalCer), липидным агонистом инвариантных естественных Т-киллеров (iNKT) [2]. Механизм LPS-индуцированного воспаления включает связывание LPS в рецепторный комплекс с толл-подобным рецептором 4 (TLR4) [18] и запуск канонического пути активации NF-κB, что ведёт к экспрессии медиаторов воспаления, таких как интерлейкин 1β (IL-1β), TNF-α и интерлейкин 6 (IL-6), вовлечённых в развитие острого воспалительного ответа в лёгких [15].

SIRT1 играет ключевую роль в разрешении воспаления при заболеваниях дыхательных путей [22, 27], что делает ак-

туальным изучение механизмов действия препаратов, направленных на повышение активности SIRT1 при воспалительных заболеваниях лёгких. Ингаляционный гексапептид Лейтрагин, агонист δ-опиоидных рецепторов, повышает уровни мРНК SIRT1 в условиях моделирования острого воспаления лёгких, что ведёт к деацетилированию остатков лизина в сайтах ядерной локализации HMGB1 и подавлению секреции провоспалительного белка высокой подвижности В1 (HMGB1) [10]. При курсовом введении ингаляционный Лейтрагин подавляет продукцию IL-6 в лёгких в условиях моделирования воспаления лёгких и ОРДС у мышей [1]. Однако влияние Лейтрагина на временные профили экспрессии мРНК SIRT1 и провоспалительных цитокинов требует дополнительного изучения.

Цель работы — изучить профили экспрессии мРНК SIRT1 и провоспалительных медиаторов IL-1β, TNF-α, IL-6 в лёгких мышей линии C57BL/6 в условиях моделирования острого воспаления лёгких, а также эффекты ингаляционного введения Лейтрагина на указанные профили экспрессии мРНК SIRT1, IL-1β, TNF-α, IL-6 в заданных условиях.

Материалы и методы

Расходные материалы

α-GalCer и LPS (*E. coli* 055:B5) были приобретены в «Sigma-Aldrich» («Merck», США). Гексапептид Лейтрагин (Н-Тур-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg-ОН диацетат) был приобретён в ООО «Бион» (Россия). Набор РНК-экстрактов для извлечения РНК был приобретён в ООО «Синтол» (Россия). Набор РЕВЕРТА-Л для синтеза кДНК был получен от ООО «АмплиСенс» (Россия). Золетил 100, седамидин и антиседан были получены от «Virbac» (Франция), «Interchemie» (Нидерланды) и «Orion Pharma» (Финляндия). Все остальные реа-

генты были приобретены в «Sigma-Aldrich» («Merck», США).

Лабораторные животные

Исследования проводились в ФГБУН НЦБМТ ФМБА России на мышах линии C57BL/6Y, самцах в возрасте 10–12 недель, средней массой $20 \pm 2,0$ г. Животные были получены из филиала «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России (Московская обл.) и отобраны в эксперимент методом рандомизации. Мышей содержали в микроизоляторной системе Rair IsoSystem по 6 особей в группе. Животные соответствовали категории улучшенных конвенциональных. В качестве рациона получали стандартный комбикорм гранулированный полнорацонный для лабораторных животных (экструдированный) ПК-120 ГОСТ Р 51849-2001 Р.5. Водопроводная очищенная вода всем животным давалась *ad libitum* в стандартных поилках. Животные содержались в контролируемых условиях окружающей среды при температуре воздуха 18–22°C, относительной влажности 60–70% и искусственном освещении с циклом 12/12.

Исследования проводились в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета о защите животных, используемых в научных целях от 22.09.2010 г.; Базельской декларацией (2011); Федеральным законом от 12.04.2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств»; ГОСТ 53434-2009 от 02.12.2009 г. «Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP)»; Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 г. № 89 «Об ут-

верждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза»; Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 г. № 81 «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств»; Решением Коллегии Евразийской экономической комиссии от 26.11.2019 г. № 202 «Об утверждении Руководства по доклиническим исследованиям безопасности в целях проведения клинических исследований и регистрации лекарственных препаратов»; Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств [4]; Руководством по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях [3]. Все эксперименты были одобрены биоэтической комиссией ФГБУН НЦБМТ ФМБА России.

Модель остро́го воспаления лёгких

Острое воспаление лёгких и ОРДС моделировали на мышах линии C57BL/6, как детально описано в [1]. Схема исследования представлена на рис. 1.

Животным моделировали острое поражение лёгких и респираторный дистресс-синдром последовательным введением α -галактозилцерамида, ингаляционно в дозе 1 мкг/мышь, и через 24 ч — комбинации липополисахарида *E. coli* в дозе 300 мкг/мышь с добавлением 100 мкг/мышь мурамилпептида и 10 мкл/мышь полного адьюванта Фрейнда, здесь и далее обозначаемой как «LPS», интратрахе-

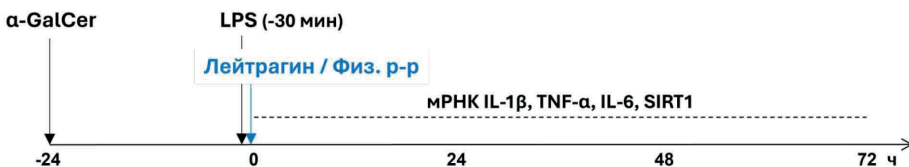


Рис. 1. Схема исследования.
Fig. 1. Study design.

ально под инъекционным наркозом, состоящим из комбинации препаратов — Золетил 100 («Virbac», Франция) и Медетамидин («Ari-San», Россия) в дозе 12,5 и 1 мг/кг соответственно, а также сразу после проведения хирургической манипуляции вводился Антиседан («Orion Pharma», Финляндия) подкожно в дозе 2,5 мг/кг, что способствовало снятию нежелательных эффектов на организм мыши и быстрому выходу из наркоза. Животные были рандомизированы в две группы по 75 животных в каждой. В первой контрольной группе животные через 30 мин после инъекции LPS получили 100 мкл физ. р-ра однократной ингаляцией. Во второй группе животные получили 0,1 мг/кг Лейтрагина в виде 100 мкл р-ра с концентрацией 0,02 мг/мл. По пять животных из каждой группы выводилось из эксперимента в следующих временных точках: 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 12,0; 18,0; 24,0; 48,0 и 72,0 ч после введения физ. р-ра или Лейтрагина. Образцы ткани легких, извлеченные после эвтаназии животных, помещались в пробирку типа Eppendorf объемом 2 мл.

ПЦР в реальном времени

Общую РНК экстрагировали из образцов лёгких с помощью набора «РНК-экстран» («Синтол», Россия) и переводили в комплементарную ДНК с помощью набора «РЕВЕРТА-Л» («АмплиСенс», Россия) в соответствии с инструкциями производителей. Уровни транскрипции генов, кодирующих белки IL-1 β , TNF- α , IL-6 и SIRT1 в исследуемых пробах лёгких, определялись с помощью амплификатора CFX-96 («Bio-Rad», США) с использованием специфических праймеров и флуоресцентных зондов, указанных в таблице. В качестве референсного гена был выбран ген *GAPDH*. Результаты измерений представляли как среднее кратное изменение уровней мРНК целевого гена относительно исходного значения в контрольной группе на 15-й минуте эксперимента (n=5).

Статистический анализ

Статистический анализ проводили с помощью t-критерия Стьюдента, однофакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями (one-way RM ANOVA) с апостериорным тестом Даннетта (Dunnett's test) или двухфакторного дисперсионного анализа (two-way ANOVA) с апостериорным тестом Бонферрони (Bonferroni's test) для множественных сравнений между группами с использованием программного обеспечения GraphPad Prism v.8.3.0 («San Diego», США). Критерий Колмогорова — Смирнова применяли для выбора параметрических или непараметрических методов статистического анализа. Интерполяция кривых проводилась сплайнами Акима. Были использованы следующие обозначения: M — среднее, m — стандартная ошибка, n — объём выборки, p — достигнутый уровень значимости. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследований

Профили мРНК SIRT1 и провоспалительных цитокинов IL-1 β , TNF- α и IL-6 в лёгких мышей линии C57BL/6 после индукции острого воспаления лёгких LPS и однократного ингаляционного введения физ. р-ра показаны на рис. 2.

Введение LPS вызывает синхронные осцилляции уровней мРНК цитокинов и SIRT1 в лёгких в течение 72 ч после индукции воспаления, причём статистически значимое повышение амплитуды уровней мРНК наблюдается на 5 ч для всех молекул. Однофакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями (one-way RM ANOVA) выявил статистически значимые изменения уровней мРНК IL-1 β ($F_{14,56} = 9,901$; $p < 0,0001$), TNF- α ($F_{14,56} = 20,31$; $p < 0,0001$), IL-6 ($F_{14,56} = 10,25$; $p < 0,0001$) и SIRT1 ($F_{14,56} = 8,044$; $p < 0,0001$) в интервале 0,25–72 ч. Апостериорный тест Даннетта показал статистически значимое 50-кратное повышение уровней мРНК IL-1 β с пиком

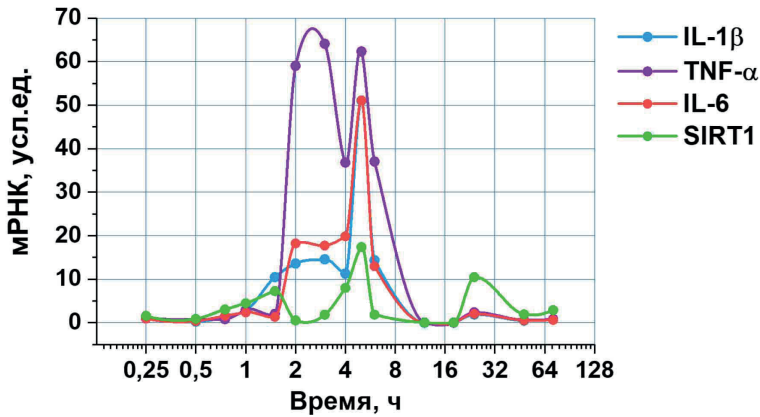


Рис. 2. Профили мРНК IL-1 β , TNF- α , IL-6 и SIRT1 в тканях лёгких мышей линии C57BL/6 с острым воспалением лёгких, индуцированным LPS, в интервале 0,25–72 ч.

Примечание: символы — $M \pm m$ ($n=5$) экспериментальных значений в указанных временных точках; линии — интерполяция сплайнами Акима.

Fig. 2. IL-1 β , TNF- α , IL-6, and SIRT1 mRNA profiles in lung tissues of C57BL/6 mice with LPS-induced acute lung inflammation between 0.25 and 72 hours.

Note: Symbols are $M \pm m$ ($n=5$) experimental values at the indicated time points; lines are interpolation by Akeem splines.

на 5 ч ($p < 0,0001$), 60-кратное повышение уровней мРНК TNF- α с пиками на 3 и 5 ч ($p < 0,0001$), 50-кратное повышение уровней мРНК IL-6 с пиком на 5 ч ($p < 0,0001$), а также 10-кратное и 7-кратное повышение уровней мРНК SIRT1 с пиками на 5 ч ($p < 0,0001$) и 24 ч ($p < 0,01$) относительно соответствующих исходных значений (временная точка 0,25 ч). Высокие уровни TNF- α наблюдались уже в интервале от 2 до 3 ч, что указывает на лидирующую роль TNF- α в раннем периоде воспаления. Однократное введение LPS вызывает осцилляцию уровней мРНК SIRT1 с тремя выраженными пиками, причём статистически значимое относительно исходного повышения мРНК наблюдается на 5 ч (вместе с другими молекулами) и на 24 ч, когда транскрипция провоспалительных цитокинов уже затухает.

Однократное введение Лейтрагина ведёт к статистически значимым изменениям профилей мРНК SIRT1 и цитокинов (рис. 3).

Двухфакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA) показал статистически значимый основной эффект Лейтрагина

на уровни мРНК IL-1 β ($F_{1,120}=12,30$; $p < 0,001$), TNF- α ($F_{1,120}=24,00$; $p < 0,0001$), IL-6 ($F_{1,120}=6,688$; $p < 0,01$) и SIRT1 ($F_{1,120}=26,32$; $p < 0,0001$), а также эффект фактора времени на указанные профили мРНК ($p < 0,001$) по сравнению с контролем. Апостериорный тест Бонферрони для множественных сравнений показал, что Лейтрагин статистически значимо повышал экспрессию мРНК SIRT1 (рис. 3а; $p < 0,05$ до $p < 0,0001$), снижая при этом амплитуды осцилляций мРНК провоспалительных цитокинов IL-1 β , TNF- α и IL-6 (рис. 3б–д; $p < 0,0001$).

Сравнение площадей под кривыми осцилляций мРНК в период с 0,25 до 72 ч показывает, что Лейтрагин повышает транскрипцию SIRT1 в 2,5 раза, снижая при этом транскрипцию провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6 и TNF- α в 1,9; 1,6 и 1,9 раза соответственно (рис. 4).

Обсуждение результатов

В настоящей работе изучены профили изменений лёгочных уровней мРНК провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6

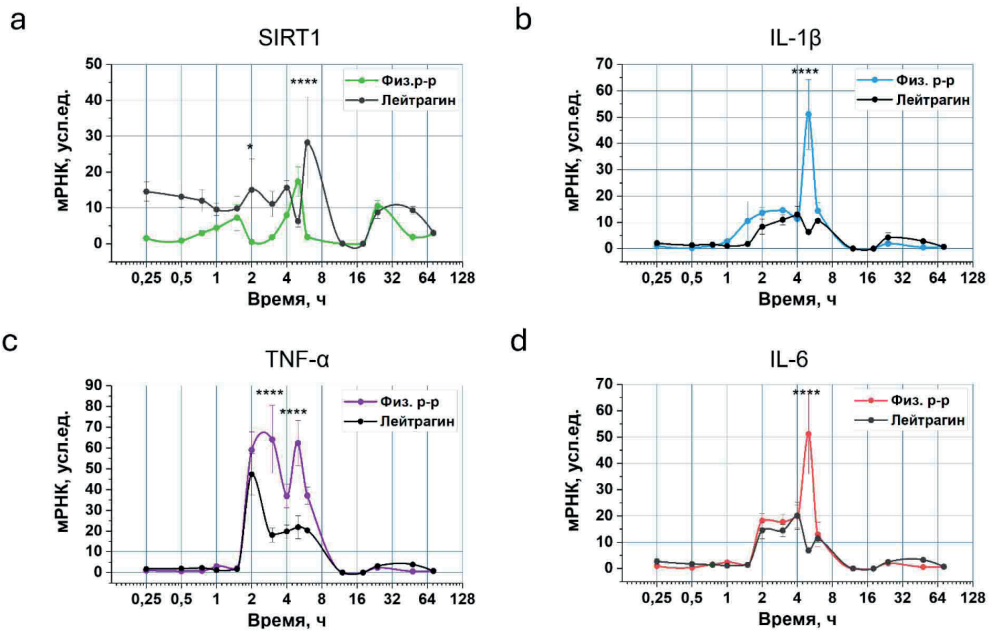


Рис. 3. Эффекты однократного ингаляционного введения Лейтрагина на уровни мРНК SIRT1 (a), IL-1 β (b), TNF- α (c) и IL-6 (d) в лёгких мышей C57BL/6 с острым воспалением лёгких, индуцированным LPS, в интервале 0,25–72 ч.

Примечание: символы — $M \pm m$ ($n=5$) экспериментальных значений в указанных временных точках; линии — интерполяция сплайнами Акима; * — $p < 0,05$, **** — $p < 0,0001$ по сравнению с контролем (физ. р-р).

Fig. 3. Effects of single inhalation administration of Leutragin on mRNA levels of SIRT1 (a), IL-1 β (b), TNF- α (c) and IL-6 (d) in the lungs of C57BL/6 mice with LPS-induced acute lung inflammation between 0.25 and 72 hours.

Note: symbols are $M \pm m$ ($n=5$) experimental values at the indicated time points; lines are interpolation by Akeem splines; * — $p < 0.05$, **** — $p < 0.0001$ compared to control (saline).

и TNF- α и деацетилазы SIRT1 у мышей в интервале от 15 мин до 72 ч после однократного введения LPS, моделирующего острое воспаление лёгких. Впервые показано, что введение LPS вызывает синхронные колебания (осцилляции) уровней мРНК IL-1 β , IL-6, TNF- α и SIRT1 в лёгких, характеризующиеся периодическими подъёмами и падениями концентраций мРНК во времени. Наличие осцилляций является аргументом в пользу гипотезы о роли SIRT1 как элементе, обеспечивающем отрицательную обратную связь в системе регуляции воспалительного ответа, вызываемого транскрипционным фактором NF- κ B [13], т. к. возникновение осцилляций в биологических системах требует наличия отрицательной обратной связи [25]. Сравнение

временных профилей экспрессии мРНК провоспалительных цитокинов и SIRT1 показывает, что амплитуды осцилляций мРНК цитокинов максимальны в период 5 ч после введения LPS, тогда как высокие уровни мРНК SIRT1 наблюдаются в период до 24 ч, когда осцилляции мРНК цитокинов уже затухают, что в целом согласуется с представлениями о роли SIRT1 как о факторе, действующем в фазе разрешения воспаления, следующей за острой фазой воспаления [10–13].

Лейтрагин играет роль дополнительного индуктора мРНК SIRT1 в условиях воспаления, что ведёт к общему повышению уровней мРНК SIRT1 и усилению отрицательной обратной связи, ограничивающей экспрессию провоспалительных цитокинов.

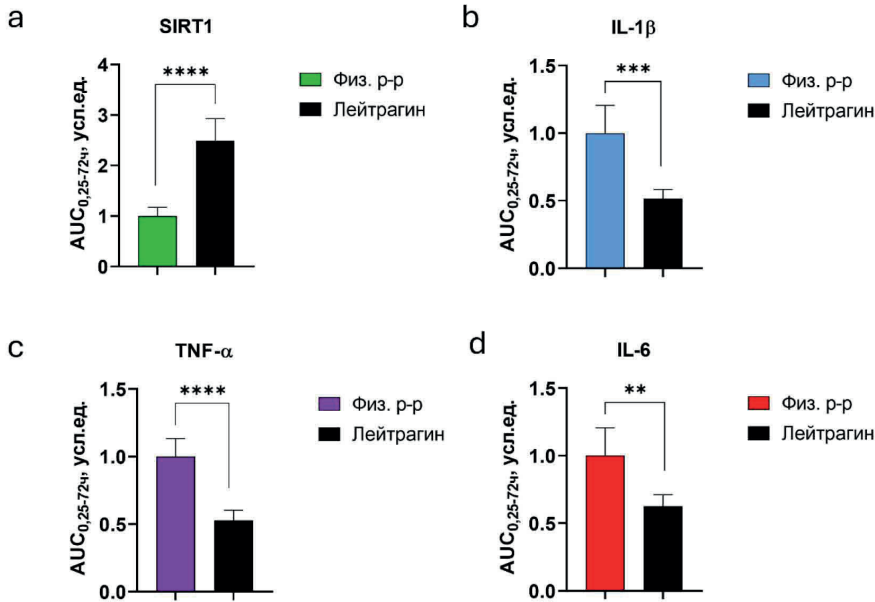


Рис. 4. Эффекты однократного ингаляционного введения Лейтрагина на площади под кривыми осцилляций мРНК SIRT1 (a), IL-1β (b), TNF-α (c) и IL-6 (d) в лёгких мышей линии C57BL/6 с острым воспалением лёгких, индуцированным LPS, за период 0,25–72 ч.

Примечание: столбцы — $M \pm m$ ($n=5$); ** — $p < 0,01$, *** — $p < 0,001$, **** — $p < 0,0001$ по сравнению с контролем (физ. р-р).

Fig. 4. Effects of single inhalation administration of Leutragin on the areas under the oscillation curves of SIRT1 (a), IL-1β (b), TNF-α (c) and IL-6 (d) mRNA mRNA in the lungs of C57BL/6 mice with LPS-induced acute lung inflammation over a period of 0.25–72 hours.

Note: Columns are $M \pm m$ ($n=5$); ** — $p < 0.01$, *** — $p < 0.001$, **** — $p < 0.0001$ compared to control (saline).

С учётом результатов, полученных в настоящей работе, можно представить предположительную схему действия Лейтрагина как противовоспалительного препарата, влияющего на эпигенетические механизмы разрешения воспаления с участием деацетилазы SIRT1 (рис. 5).

С учётом того, что Лейтрагин также подавляет секрецию HMGB1, медиатора тяжёлого и летального воспаления [23], полученные в настоящей работе результаты указывают на универсальность противовоспалительного действия Лейтрагина, затрагивающего множество провоспалительных сигнальных путей, что отличает этот препарат от глюкокортикоидов и моноклональных антител.

Заключение

В настоящей работе впервые показано, что моделирование острого воспаления лёгких *in vivo* однократным интратрахеальным введением липополисахарида (LPS) вызывает синхронные осцилляции мРНК SIRT1 и провоспалительных цитокинов в лёгких, что согласуется с известной гипотезой о роли SIRT1 как элементе, обеспечивающем отрицательную обратную связь в системе регуляции активности канонического пути активации NF-κB. Амплитуды осцилляций мРНК провоспалительных цитокинов IL-1β, IL-6 и TNF-α максимальны в ранней фазе острого воспаления (период от 1,5 до 5 ч), тогда как высокие уровни мРНК SIRT1 наблюдаются в пери-

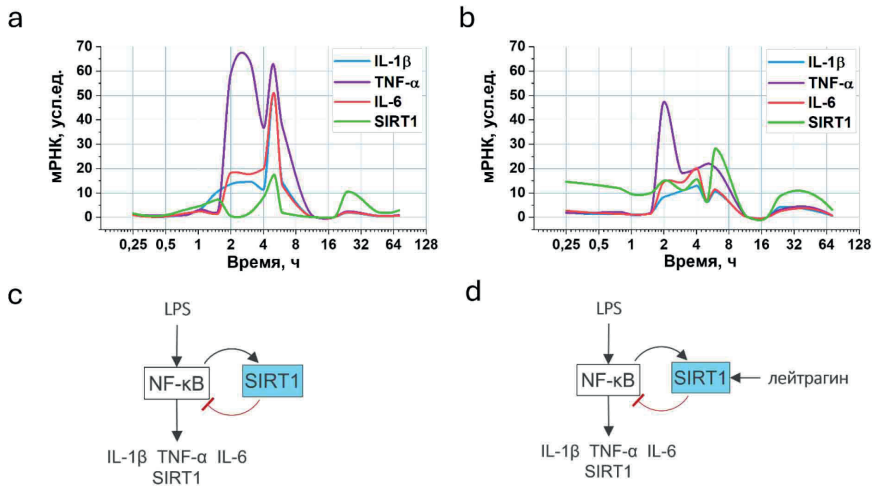


Рис. 5. Схема противовоспалительного действия Лейтрагина. LPS вызывает повышение уровней мРНК IL-1β, IL-6, TNF-α и SIRT1 в форме синхронных осцилляций (а), вызванных взаимодействием NF-κB и SIRT1, где SIRT1 играет роль обратной отрицательной связи, инактивирующей NF-κB и ограничивающей воспалительный ответ [6–13] (с). Лейтрагин проявляет противовоспалительный эффект, снижая амплитуды осцилляций мРНК провоспалительных цитокинов IL-1β, IL-6 и TNF-α через дополнительную индукцию мРНК SIRT1 (b), что ведёт к усилению обратной отрицательной связи с участием SIRT1 и снижению экспрессии мРНК провоспалительных цитокинов (d).

Fig. 5. Scheme of the anti-inflammatory action of Leustragin. LPS causes an increase in the mRNA levels of IL-1β, IL-6, TNF-α and SIRT1 in the form of synchronized oscillations (a) caused by the interaction between NF-κB and SIRT1, where SIRT1 plays the role of negative feedback inactivating NF-κB and limiting the inflammatory response [6-13] (c). Leustragin exhibits anti-inflammatory effects by reducing the amplitudes of mRNA oscillations of pro-inflammatory cytokines IL-1β, IL-6 and TNF-α through additional induction of SIRT1 mRNA (b), leading to enhanced negative feedback involving SIRT1 and decreased mRNA expression of pro-inflammatory cytokines (d).

од до 24 ч, когда осцилляции мРНК провоспалительных цитокинов уже затухают, что в целом согласуется с представлениями о роли SIRT1 как о факторе, действующем в фазе разрешения воспаления, следующей за острой фазой воспаления.

Лейтрагин проявляет противовоспалительное действие, вызывая дополнительную опережающую индукцию мРНК SIRT1 и снижая амплитуду осцилляций мРНК противовоспалительных цитокинов IL-1β, IL-6 и TNF-α.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

- Каркищенко В.Н., Помыткин И.А., Петрова Н.В., Нестеров М.С., Агельдинов Р.А., Зотова Л.В., Колоскова Е.М., Слободенюк В.В., Скворцова В.И. Лейтрагин подавляет экспрессию цитокинов, включая интерлейкин-6, в модели «цитокинового шторма» у мышей линии C57BL/6Y с индуцированным острым респираторным дистресс-синдромом. *Биомедицина*. 2020;16(4):34–43. [Karkischenko V.N., Pomytkin I.A., Petrova N.V., Nesterov M.S., Ageldinov R.A., Zotova L.V., Koloskova E.M., Slobodenyuk V.V., Skvortsova V.I. Leustragin podavlyayet ekspressiyu tsitokinov, vkladyaya interleykin-6, v modeli «tsitokinovogo shtorma» u myshey linii C57BL/6Y s indutsirovannym ostrym respiratornym distress-sindromom [Leustragin inhibits expression of cytokines, including interleukin-6, in a “cytokine storm” model in C57BL/6Y mice with induced acute respiratory distress syndrome]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2020;16(4):34–43. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-16-4-34-43
- Помыткин И.А., Каркищенко В.Н., Фокин Ю.В., Нестеров М.С., Петрова Н.В. Модель фатального острого поражения лёгких и острого респираторного дистресс-синдрома. *Биомедицина*.

- 2020;16(4):24–33. [Pomytkin I.A., Karkischenko V.N., Fokin Yu.V., Nesterov M.S., Petrova N.V. Model' fatal'nogo ostrogo porazheniya legkikh i ostrogo respiratornogo distress-sindroma [A model of fatal acute lung injury and acute respiratory distress syndrome]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2020;16(4):24–33. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-16-4-24-33
3. *Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях*. Под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. М.: Профиль-2С, 2010. [*Rukovodstvo po laboratornym zhitivotnym i al'ternativnym modelyam v biomeditsinskikh issledovaniyakh [A guide to laboratory animals and alternative models in biomedical research]*]. Ed. by N.N. Karkischenko, S.V. Grachev. Moscow: Profil'-2C Publ., 2010. (In Russian)].
4. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая*. Под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К, 2012. [*Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. Chast' pervaya [Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. Part one]*]. Ed. by A.N. Mironov. Moscow: Grif i K Publ., 2012. (In Russian)].
5. Cao Y., Lopatkin A., You L. Elements of biological oscillations in time and space. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2016;23(12):1030–1034. DOI: 10.1038/nsmb.3320
6. Chen L.F., Mu Y., Greene W.C. Acetylation of RelA at discrete sites regulates distinct nuclear functions of NF-kappaB. *EMBO J.* 2002;21(23):6539–6548. DOI: 10.1093/emboj/cdf660
7. Chen R., Dioum E.M., Hogg R.T., Gerard R.D., Garcia J.A. Hypoxia increases sirtuin I expression in a hypoxia-inducible factor-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 2011;286(16):13869–13878. DOI: 10.1074/jbc.M110.175414
8. D'Alessio F.R. Mouse models of acute lung injury and ARDS. *Methods Mol. Biol.* 2018;1809:341–350. DOI: 10.1007/978-1-4939-8570-8_22
9. Ferreira-Coimbra J., Sarda C., Rello J. Burden of community-acquired pneumonia and unmet clinical needs. *Adv. Ther.* 2020;37(4):1302–1318. DOI: 10.1007/s12325-020-01248-7
10. Karkischenko V.N., Skvortsova V.I., Gasanov M.T., Fokin Y.V., Nesterov M.S., Petrova N.V., Alimkina O.V., Pomytkin I.A. Inhaled [D-Ala2]-dynorphin 1–6 prevents hyperacetylation and release of high mobility group box 1 in a mouse model of acute lung injury. *J. Immunol Res.* 2021;2021:4414544. DOI: 10.1155/2021/4414544
11. Katto J., Engel N., Abbas W., Herbein G., Mahlknecht U. Transcription factor NFkB regulates the expression of the histone deacetylase SIRT1. *Clin. Epigenetics.* 2013;5(1):11. DOI: 10.1186/1868-7083-5-11
12. Kauppinen A., Suuronen T., Ojala J., Kaarniranta K., Salminen A. Antagonistic crosstalk between NF-kB and SIRT1 in the regulation of inflammation and metabolic disorders. *Cell Signal.* 2013;25(10):1939–1948. DOI: 10.1016/j.cellsig.2013.06.007
13. Kiernan R., Brès V., Ng R.W., Coudart M.P., El Messaoudi S., Sardet C., Jin D.Y., Emiliani S., Benkirane M. Post-activation turn-off of NF-kappa B-dependent transcription is regulated by acetylation of p65. *J. Biol. Chem.* 2003;278(4):2758–2766. DOI: 10.1074/jbc.M209572200
14. Lim J.H., Lee Y.M., Chun Y.S., Chen J., Kim J.E., Park J.W. Sirtuin 1 modulates cellular responses to hypoxia by deacetylating hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol. Cell.* 2010;38(6):864–878. DOI: 10.1016/j.molcel.2010.05.023
15. Liu T., Zhang L., Joo D., Sun S.C. NF-kB signaling in inflammation. *Signal Transduct. Target Ther.* 2017;2:17023. DOI: 10.1038/sigtrans.2017.23
16. Liu X., Wang N., Zhu Y., Yang Y., Chen X., Fan S., Chen Q., Zhou H., Zheng J. Inhibition of extracellular calcium influx results in enhanced IL-12 production in LPS-treated murine macrophages by down-regulation of the CaMKKβ-AMPK-SIRT1 signaling pathway. *Mediators Inflamm.* 2016;2016:6152713. DOI: 10.1155/2016/6152713
17. Rubenfeld G.D., Caldwell E., Peabody E., Weaver J., Martin D.P., Neff M., Stern E.J., Hudson L.D. Incidence and outcomes of acute lung injury. *N. Engl. J. Med.* 2005;353(16):1685–1693. DOI: 10.1056/NEJMoa050333
18. Shimazu R., Akashi S., Ogata H., Nagai Y., Fukudome K., Miyake K., Kimoto M. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J. Exp. Med.* 1999;189(11):1777–1782. DOI: 10.1084/jem.189.11.1777
19. Voelter-Mahlknecht S., Mahlknecht U. Cloning, chromosomal characterization and mapping of the NAD-dependent histone deacetylases gene sirtuin 1. *Int. J. Mol. Med.* 2006;17(1):59–67. DOI: 10.3892/ijmm.17.1.59
20. Wang C., Chen L., Hou X., Li Z., Kabra N., Ma Y., Nemoto S., Finkel T., Gu W., Cress W.D., Chen J. Interactions between E2f1 and Sirt1 regulate apoptotic response to DNA damage. *Nat. Cell Biol.* 2006;8(9):1025–1031. DOI: 10.1038/ncb1468
21. Wu Q.J., Zhang T.N., Chen H.H., Yu X.F., Lv J.L., Liu Y.Y., Liu Y.S., Zheng G., Zhao J.Q., Wei Y.F., Guo J.Y., Liu F.H., Chang Q., Zhang Y.X., Liu C.G., Zhao Y.H. The sirtuin family in health and disease. *Signal Transduct. Target Ther.* 2022;7(1):402. DOI: 10.1038/s41392-022-01257-8
22. Yang Y., Liu Y., Wang Y., Chao Y., Zhang J., Jia Y., Tie J., Hu D. Regulation of SIRT1 and its roles in inflammation. *Front. Immunol.* 2022;13:831168. DOI: 10.3389/fimmu.2022.831168
23. Yeung F., Hoberg J.E., Ramsey C.S., Keller M.D., Jones D.R., Frye R.A., Mayo M.W. Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J.* 2004;23(12):2369–2380. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600244
24. Yuan J., Minter-Dykhouse K., Lou Z. A C-Myc-Sirt1 feedback loop regulates cell growth and transformation. *J. Cell Biol.* 2009;185(2):203–211. DOI: 10.1083/jcb.200809167

25. Zhang H.N., Li L., Gao P., Chen H.Z., Zhang R., Wei Y.S., Liu D.P., Liang C.C. Involvement of the p65/RelA subunit of NF-kappaB in TNF-alpha-induced SIRT1 expression in vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010;397(3):569–575. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.05.160
26. Zhang Z., Lowry S.F., Guarente L., Haimovich B. Roles of SIRT1 in the acute and restorative phases following induction of inflammation. *J. Biol. Chem.* 2010;285(53):41391–41401. DOI: 10.1074/jbc.M110.174482
27. Zhou Y., Zhang F., Ding J. As a modulator, multitasking roles of SIRT1 in respiratory diseases. *Immune Netw.* 2022;22(3):e21. DOI: 10.4110/in.2022.22.e21

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

Огнева Настасья Сергеевна*, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: ognevanastya@mail.ru

Nastasya S. Ogneva*, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: ognevanastya@mail.ru

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

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

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

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

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

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

<https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-3-21-27>



ОПЫТ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ КОЛЛЕКЦИИ МАКАК-РЕЗУСОВ ПО ГЕНАМ КЛАССА I ГЛАВНОГО КОМПЛЕКСА ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ

С.В. Орлов¹, А.А. Агумава¹, И.Д. Курдюков², П.П. Бельтюков^{2,*}

¹ Курчатовский комплекс медицинской приматологии, НИЦ «Курчатовский институт»
354376, Российская Федерация, Сочи, Адлерский р-н, с. Весёлое, ул. Мира, стр. 177

² ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии
и экологии человека» ФМБА России
188663, Российская Федерация, Ленинградская обл., Всеволожский м/р-н,
г.п. Кузьмоловский, ул. Заводская, зд. 6/2, корп. 93

Полезность биомодели в доклинических исследованиях зависит от полноты знаний о ней. Нечеловекообразные приматы — единственная из близких к человеку биомоделей, доступных для доклинической оценки биотехнологических продуктов. Отсутствие иммуногенетических характеристик используемых приматов существенно ограничивает возможности анализа полученных результатов. Наличие сведений о гаплотипе главного комплекса гистосовместимости (major histocompatibility complex, МНС) повышает ценность биомодели. Генотипирование приматов по локусу МНС путём анализа ДНК исключено, поскольку представленность отдельных белков МНС зависит не от их присутствия в геноме биомодели, а от уровня экспрессии в клетках. Поэтому генотипирование приматов по локусу МНС проводят путём анализа мРНК, кодирующих аллельные варианты белков. В представленной работе приведены результаты генотипирования выборки макак-резусов из коллекции Курчатовского комплекса медицинской приматологии с использованием технологии секвенирования следующего поколения на секвенаторе IonProton.

Ключевые слова: макаки-резусы, главный комплекс гистосовместимости, генотипирование

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: работа выполнена в рамках гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № 075-15-2021-1065.

Для цитирования: Орлов С.В., Агумава А.А., Курдюков И.Д., Бельтюков П.П. Опыт генотипирования коллекции макак-резусов по генам класса I главного комплекса гистосовместимости. *Биомедицина*. 2024;20(3):21–27. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-3-21-27>

Поступила 08.04.2024

Принята после доработки 10.06.2024

Опубликована 10.09.2024

EXPERIENCE OF GENOTYPING OF THE CLASS 1 MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX GENES IN A RHESUS MACAQUES COLLECTION

Sergey V. Orlov¹, Aslan A. Agumava¹, Ivan D. Kurdyukov², Petr P. Beltyukov^{2,*}

¹ Kurchatov Complex of Medical Primatology, Kurchatov Institute
354376, Russian Federation, Sochi, Adler District, Veseloe Village, Mira Str., 177

² *Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology
of the Federal Medical and Biological Agency of Russia
188663, Russian Federation, Leningrad Region, Vsevolozhsky Municipal District,
Kuzmolovsky Urban Settlement, Zavodskaya Str., 6/2, Build. 93*

The utility of animal models in preclinical research depends on the completeness of our knowledge about these models. Nonhuman primates are the closest animal model to humans, available for preclinical evaluation of biotechnological products. The lack of immunogenetic characteristics of the primates used in a particular study significantly limits the possibilities of analyzing the results obtained. The availability of information about the haplotype of the major histocompatibility complex (MHC) increases the overall significance of the model. Genotyping of primates at the MHC locus by DNA analysis is excluded, since the representation of individual MHC proteins depends on the level of their expression in immune cells, rather than on their presence in the genome. Therefore, the genotyping of primates at the MHC locus is carried out by analyzing mRNA encoding allelic variants of proteins. This work presents the results of genotyping of a sample of rhesus macaques from the collection of the Kurchatov Complex of Medical Primatology by a next-generation sequencing technology using an IonProton sequencer.

Keywords: rhesus macaques, major histocompatibility complex, genotyping

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

Funding: the work was supported by the grant of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation No. 075-15-2021-1065.

For citation: Orlov S.V., Agumava A.A., Kurdyukov I.D., Beltyukov P.P. Experience of Genotyping of the Class I Major Histocompatibility Complex Genes in a Rhesus Macaques Collection. *Journal Biomed.* 2024;20(3):21–27. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-3-21-27>

Submitted 08.04.2024

Revised 10.06.2024

Published 10.09.2024

Введение

Нечеловекообразные приматы (НЧП) являются важной биомоделью для оценки безопасности и эффективности фармакологических средств, создаваемых на основе биотехнологических разработок. Поэтому генотипирование макак по главному комплексу гистосовместимости (major histocompatibility complex, МНС) — одно из условий, обеспечивающих полноту характеристики биомодели. Для коллекций НЧП, имеющих в России, отсутствуют иммуногенетические характеристики гаплотипов белков главного комплекса гистосовместимости, поэтому в ходе доклинических исследований не могут быть учтены возможные особенности индивидуального ответа, обусловленные гаплотипом белков МНС.

Сложность строения и особенности экспрессии генов МНС приматов не позволя-

ют использовать методы анализа, пригодные для генотипирования по локусу HLA у человека, и диктуют особые требования при типировании НЧП [8].

Гены, кодирующие белки МНС, являются наиболее полиморфными в геноме позвоночных животных. В связи с этим полноценная интерпретация данных об адаптивном гуморальном и/или клеточном иммунном ответе на воздействие новых средств при проведении доклинических испытаний требует знаний о структуре соответствующих рецепторов МНС, вовлечённых в процессы представления антигенов.

Макаки-резусы (*Macaca mulatta*) филогенетически близки к человеку и активно используются при изучении механизмов биологической защиты от инфекций и иммунного ответа при трансплантации и вакцинации [6]. Различия в локусе МНС

у макак-резусов из разных регионов подтверждаются результатами генотипирования популяций животных разного происхождения в коллекциях приматов по всему миру. Отличительная особенность МНС приматов — наличие «избыточного» количества генов, кодирующих эти белки. Так, у человека гаплотипы генов HLA класса I содержат только три главных гена (*HLA-A*, *HLA-B* и *HLA-C*) и три минорных (*HLA-E*, *HLA-F* и *HLA-G*), а в локусе МНС класса I макак в процессе эволюции произошли неоднократные сегментарные удвоения, поэтому у животных с разными гаплотипами МНС количество генов (*Mamu*), кодирующих белки МНС, может различаться [1]. У макак экспрессируются несколько аллелей гена *Mamu-A* и до 10 вариантов *Mamu-B*. Многие аллели генов МНС I экспрессируются на достаточно низких уровнях, а иногда вообще не экспрессируются. Такая дифференциация может быть достигнута только при наличии надёжного транскрипционного контроля [7]. Иммунный ответ на патогены происходит только за счёт тех аллелей МНС, которые экспрессируются на самом высоком уровне. Анализ транскрипции генов локуса МНС I даёт возможность максимально полно охарактеризовать биомодель и сравнить с человеком на более высоком уровне по сравнению с теми возможностями, которые даёт секвенирование ДНК [2]. Необходимость исследований в данном направлении подтверждается публикациями последних лет, в которых были продемонстрированы возможности использования НЧП для моделирования патологических состояний человека, риск которых возрастает при наличии ряда аллельных вариантов HLA класса I, например, *HLA-B*27* [5]. В работах по моделированию иммунодефицитных состояний, вызываемых у обезьян вирусом SIV (simian immunodeficiency virus), показано, что наличие аллелей *Mamu* (*A*02*, *A*08*, *A*11* и *B*01*, *B*03*) обеспечивает представ-

ление антигенов, характерных для вариантов *HLA-B* человека, благодаря высокой гомологии пептид-связывающих участков белковых молекул *HLA-B* (*B*18:01*, *B*27:09*, *B*27:03*, *B*51:01*, *B*40:06*) и перечисленных вариантов *Mamu* [3].

Цель работы — разработка метода генотипирования локуса МНС I макак-резусов на основе анализа результатов секвенирования фрагмента генов *Mamu-A* и *Mamu-B* с использованием технологии NGS на секвенаторе IonProton и частичная характеристика популяции макак-резусов из коллекции Курчатовского комплекса медицинской приматологии.

Материалы и методы

Источник биоматериала — мононуклеарные клетки периферической крови, выделенные путём центрифугирования в градиенте ρ -ра фиколла (1,077 г/см³, «Биолот», Россия). Клеточный осадок обрабатывали реагентом RNA Later и сохраняли образцы при -70°C . Для выделения РНК и очистки от примесей ДНК использовали наборы RNeasy Mini Kit и RNase-Free DNase Set («Qiagen», Германия), соответственно. Образцы кДНК получили с помощью набора High-Capacity RNA-to-cDNA Kit («Applied Biosystems», США) и сохраняли при -70°C .

Целевой регион для секвенирования — фрагменты генов *Mamu*, соответствующие, в основном, $\alpha 1$ -домену белка. Амплификацию ген-специфичных участков выполняли с использованием праймеров, соответствующих консервативным последовательностям в пределах локусов МНС IA и IB [9]. Размер вставки равен 190 пар оснований (п.н.).

Праймеры ($5'$ - $3'$):

F: GCTACGTGGACGACACG

R: TCGCTCTGGTTGTAGTAGC

Конструирование библиотек

Амплификацию таргетного участка выполняли на амплификаторе T100

(«Bio-Rad», США) в смеси: 23 мкл реагента Platinum PCR SuperMix High Fidelity («Invitrogen», США), 1 мкл смеси олигонуклеотидов (по 5 пмоль) и 1 мкл кДНК. Конечная концентрация каждого олигонуклеотида — 200 нмоль/л. Для каждого образца использовали специфический прямой праймер с баркодом и одинаковый для всех образцов обратный праймер. Все образцы на стадии амплификации содержали индивидуальную метку из набора баркодов Ion Xpress DNA (01-35).

Программа амплификации: инициализация (94°C, 2 мин), затем 40 циклов: денатурация (94°C, 15 с), отжиг (55°C, 30 с), элонгация (68°C, 30 с). При успешной амплификации ПЦР-продукт при электрофорезе в агарозном геле выявлялся в виде единственной полосы, соответствующей полинуклеотиду размером 256 п.н. Продукты амплификации смешивали в соотношениях, близких к эквимольным. Полученную смесь очищали на магнитных частицах AMPure XP («Beckman Coulter», США), растворяли в воде, свободной от нуклеаз, и сохраняли при –20°C. Молярная концентрация библиотеки, измеренная с использованием набора Qubit DNA HS Assay Kit на флуориметре Qubit 2.0 («Life Technologies», США), составила 43,1 нмоль/л.

Клональную амплификацию и обогащение библиотеки кДНК с использованием набора реагентов Ion PI Template OT2 200 Kit v3 выполняли на оборудовании Ion OneTouch™ 2 System с модулем обогащения темпированных микросфер Ion OneTouch ES («Life Technologies», США) по протоколам производителя. Секвенирование выполнено на секвенаторе Ion Proton с применением набора реагентов Ion PI Sequencing 200 Kit v3 и чипов для секвенирования Ion PI Chip Kit v2 по протоколу производителя.

При первичной биоинформационной обработке выполнена фильтрация прочтений по качеству и удаление адаптерных после-

довательностей с использованием Torrent Suite Software. В результате получены файлы в формате FASTQ, с уникальными последовательностями (от 9×10^5 до 3×10^6 для каждого образца), из которых после обработки получили по 25–250 тыс. пригодных для анализа прочтений. Фильтрацию данных и отбор длинных прочтений из файлов FASTQ проводили с применением ПО PRINSEQ. На завершающей фазе анализа для выравнивания на референсные последовательности использовали только длинные чтения (180–200 п.н.). Такая обработка позволила получить для каждого образца от нескольких десятков до нескольких сотен тысяч прочтений, пригодных для генотипирования. Этот «запас прочности» необходим для последующего эффективного выравнивания полученных массивов прочтений при использовании выбранной технологии NGS.

В качестве референса использовали последовательности локуса *Mamu* из базы IPD-MHC Database (версия 3.9.0.0) (<https://www.ebi.ac.uk/ipd/mhc/group/NHP/>). Из общей базы нуклеотидных последовательностей FASTA отфильтрованы только последовательности генов MHC I. Референс для локуса *Mamu* содержал 484 варианта *Mamu-A*, 947 вариантов *Mamu-B*, 32 варианта *Mamu-E*, 9 вариантов *Mamu-G*, 24 варианта *Mamu-F*, 110 вариантов *Mamu-I*, 25 вариантов *Mamu-J*, 3 варианта *Mamu-K* и 155 вариантов *Mamu-AG* (всего 1789 последовательностей). Из этого числа для выравнивания прочтений после удаления ген-специфичных фрагментов праймеров использовали 602 короткие уникальные последовательности (размером ~154 п.н.).

Длинные чтения в формате FASTQ выравнивали на референс при помощи ПО STAR, используя настройку, позволяющую выравнивать чтения от начала и до конца, исключить возможное обрезание прочтения, а также запретить несоответствия «mismatch» при выравнивании, но без за-

прега инсерций и делеций. При выравнивании прочтения сортировались по координатам и представлялись в формате BAM. Файл индекса генерировался с помощью утилит SAMtools. Дублированные прочтения, связанные с «разрешением» инсерций и делеций, были удалены с использованием утилиты SAMtools.

Визуализацию прочтений и типирование аллелей МНС каждого образца выполняли с использованием графического средства просмотра Tablet. Минорные варианты, для которых доля прочтений оказалась < 1%, были исключены из анализа. В результате биоинформационной обработки для каждого примата получены данные о геномном варианте МНС I, позволяющие отнести его к той или иной аллельной группе.

Для исключения ложноположительных результатов проведена оценка специфичности праймеров. Последовательности праймеров выравнены на 1789 вариантах МНС I локуса *Mamu* версии 3.9.0.0 IPD-МНС. Оказалось, что 79 из 1789 вариантов имеют несоответствия на 3'-конце хотя бы одного из праймеров, поэтому амплификация ПЦР-продуктов этих вариантов невозможна. К таким вариантам относятся гены *Mamu-E*, *Mamu-F* и *Mamu-J*. Кроме того, при анализе оказалось, что 174 из 1789 вариантов будут иметь несоответствия в зоне посадки праймеров (не на 3'-конце). Амплификация ПЦР-продуктов таких вариантов также может быть затруднена и приведёт к снижению доли соответствующих картированных прочтений.

Результаты и их обсуждение

Выполнено генотипирование 25 образцов РНК макак-резусов с целью установления экспрессируемых вариантов генов *Mamu*. Показано, что у этих животных экспрессируются от 4 до 12 «мажорных» аллельных вариантов МНС I, доля которых среди картированных прочтений составляет более 1%.

В качестве примера результатов генотипирования на рисунке приведена диаграмма распределения вариантов МНС I у одного из исследованных животных.

В исследованных образцах «мажорные» варианты представлены генами *Mamu-A1* и *Mamu-B*. Среди вариантов *Mamu-A1* наиболее частыми оказались *A1*002:01:01* (13 образцов, 52%) и *A1*019/A1*003* (8 образцов, 32%). Среди вариантов *Mamu-B* наиболее распространёнными оказались *B*074* (17 образцов, 68%) и *B*012:01:01* (12 образцов, 48%). Наиболее распространённым вариантом *Mamu-A1* в изученной популяции макак-резусов оказался вариант *A1*002*, который является типичным для макак индийского происхождения и крайне редок в популяциях макак китайского происхождения [4].

При анализе полученных результатов проведена попытка сравнить наши результаты с данными о генотипировании популяций макак-резусов из коллекций китайского и индийского происхождения [4]. В иссле-

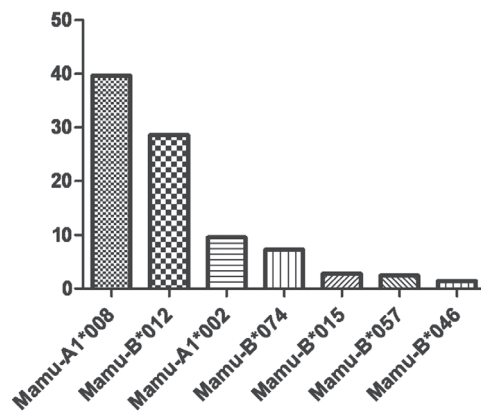


Рис. Пример паттерна экспрессии генетических вариантов МНС I макак-резусов. Представлены выявленные генетические варианты МНС I и их доля (в процентах от общего числа картированных прочтений) у самца 46782.

Fig. Example of an expression pattern of genetic variants of MHC I in Rhesus Macaques. The identified MHC I genetic variants and their share (as a percentage of the total number of mapped reads) in male 46782 are presented.

дованной группе полностью отсутствуют животные с вариантами генов *Mamu-A*, характерных для китайских популяций. Это наблюдение относится к вариантам *A1*009*, *A1*010*, *A1*027*, *A1*032* и к целому ряду других редких «китайских» вариантов *Mamu-A*.

Лишь у одного животного — самца под номером 37970, в родословной которого были предки индийского и вьетнамского происхождения, — выявлен вариант *Mamu-A2*24*, для которого имеются сведения о распространённости в китайских популяциях макак-резусов. К сожалению, отсутствие сведений о родительских и прародительских гаплотипах МНС I дальше третьего колена не позволяет говорить о возможном источнике найденного варианта. Ещё один вариант, нетипичный для индийских популяций, *A1*091* — выявлен у двух самцов под номерами 36616 и 36758. Оба этих животных имеют в шестом и в пятом коленах общего предка китайского происхождения.

Таким образом, варианты генов *Mamu-A*, выявленные у животных в исследованной коллекции, в целом соответствуют имеющимся сведениям о распространённости вариантов *Mamu-A* в различных популяциях макак-резусов, опубликованных другими исследователями.

Анализ вариантов генов *Mamu-B*, определённых при генотипировании животных из коллекции, показал, что наиболее распространённые варианты *Mamu-B*074*, *B*012* и *B*057* в исследуемой популя-

ции животных являются типичными для животных индийского происхождения и по данным публикации [8], при этом *B*074* и *B*057* — редко встречаются среди животных китайского происхождения, а *B*012*, по данным зарубежных авторов, в китайской популяции не выявляется вовсе. Также показано наличие вариантов *Mamu-B*019*, *B*022*, *B*024*, *B*027*, характерных для макак индийского происхождения. Ещё один распространённый вариант — *Mamu B*046* выявлен у 10 обследованных животных (40%).

Варианты *Mamu-B*, типичные для китайских популяций (*B*034*, *B*086*), обнаружены у животных, для которых подтверждено наличие предков из китайской популяции.

Выводы

Полученные в ходе исследования результаты подтвердили возможность применения использованной технологии NGS для анализа локуса МНС макак, была оценена экспрессия вариантов *Mamu-A* и *Mamu-B* в мононуклеарных клетках периферической крови животных, включённых в исследование.

По мере накопления данных о гаплотипах МНС I нечеловекообразных приматов, используемых в доклинических исследованиях, понадобятся дальнейшие исследования для анализа роли гаплотипа МНС биомодели в реализации иммунного ответа при воздействии биотехнологических препаратов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Котова Е.С., Каныгина А.В., Желанкин А.В., Бабенко В.В., Болдырева Д.И., Генерозов Э.В., Шарова Е.И. Генотипирование макак-резусов по генам главного комплекса гистосовместимости *Mamu-A* и *Mamu-B* с использованием нанопорового секвенирования. В сб.: III Всероссийская конференция «Высокопроизводительное секвенирование в геномике». Новосибирск: Академиздат, 2022:122. [Kotova E.S., Kanygina A.V., Zhelankin A.V., Babenko V.V., Boldyreva D.I., Generozov E.V.,

Sharova E.I. Genotipirovanie makak-rezусov po genam glavnogo kompleksa gistosovmestimosti *Mamu-A* i *Mamu-B* s ispol'zovaniem nanoporovogo sekvenirovaniya [Genotyping of rhesus macaques by genes of the main histocompatibility complex *Mamu-A* and *Mamu-B* using nanopore sequencing]. V sb.: III Vserossiyskaya konferentsiya "Ysokoproizvoditel'noe sekvenirovanie v genomike". [In: III All-Russian conference "High-performance sequencing in genomics"]. Novosibirsk: Akademizdat Publ., 2022:122. (In Russian)].

- Budde M.L., Lhost J.J., Burwitz B.J., Becker E.A., Burns C.M., O'Connor S.L., Karl J.A., Wiseman R.W., Bimber B.N., Zhang G.L., Hildebrand W., Brusica V., O'Connor D.H. Transcriptionally abundant major histocompatibility complex class I alleles are fundamental to nonhuman primate simian immunodeficiency virus-specific CD8⁺ T cell responses. *J. Virol.* 2011;85(7):3250–3261. DOI: 10.1128/JVI.02355-10
- Hickman-Miller H.D., Bardet W., Gilb A., Luis A.D., Jackson K.W., Watkins D.I., Hildebrand W.H. Rhesus macaque MHC class I molecules present HLA-B-like peptides in Chinese rhesus macaques. *G3 (Bethesda)*. 2013;3(7):1195–1201. DOI: 10.1534/g3.113.006254
- Loffredo J.T., Sidney J., Bean A.T., Beal D.R., Bardet W., Wahl A., Hawkins O.E., Piaskowski S., Wilson N.A., Hildebrand W.H., Watkins D.I., Sette A. Two MHC class I molecules associated with elite control of immunodeficiency virus replication, *Mamu-B*08* and *HLA-B*2705*, bind peptides with sequence similarity. *J. Immunol.* 2009;182(12):7763–7775. DOI: 10.4049/jimmunol.0900111
- Maness N.J. The importance of understanding MHC-I diversity in nonhuman primate models of human infectious diseases. *Toxicol. Pathol.* 2017;45(1):157–160. DOI: 10.1177/0192623316672072
- Otting N., Heijmans C.M., Noort R.C., de Groot N.G., Doxiadis G.G., van Rood J.J., Watkins D.I., Bontrop R.E. Unparalleled complexity of the MHC class I region in rhesus macaques. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005;102(5):1626–1631. DOI: 10.1073/pnas.0409084102
- Rogers J. Genomic resources for rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *Mammalian Genome.* 2022;33:91–99. DOI: 10.1007/s00335-021-09922-z
- Wiseman R.W., Karl J.A., Bimber B.N., O'Leary C.E., Lank S.M., Tuscher J.J., Detmer A.M., Bouffard P., Levenkova N., Turcotte C.L., Szekeres E. Jr., Wright C., Harkins T., O'Connor D.H. Major histocompatibility complex genotyping with massively parallel pyrosequencing. *Nature Medicine.* 2009;15(11):1322–1326. DOI: 10.1038/nm.2038

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Орлов Сергей Владимирович, д.м.н., проф., член-корр. РАН, Курчатовский комплекс медицинской приматологии, НИЦ «Курчатовский институт»;
e-mail: orloff-sv@mail.ru

Агумава Аслан Анзорович, к.б.н., Курчатовский комплекс медицинской приматологии, НИЦ «Курчатовский институт»;
e-mail: aslan39@yandex.ru

Курдюков Иван Дмитриевич, ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России;
e-mail: splachnum@yandex.ru

Бельтюков Пётр Петрович*, к.м.н., доц., ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России;
e-mail: biochem2005@rambler.ru

Sergey V. Orlov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Corresponding Member of RAS, Kurchatov Complex of Medical Primatology, Kurchatov Institute;
e-mail: orloff-sv@mail.ru

Aslan A. Agumava, Cand. Sci. (Biol.), Kurchatov Complex of Medical Primatology, Kurchatov Institute;
e-mail: aslan39@yandex.ru

Ivan D. Kurdyukov, Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: splachnum@yandex.ru

Petr P. Beltyukov*, Cand. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: biochem2005@rambler.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author



МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ПОРАЖЕНИИ

О.Н. Гайкова¹, А.А. Козлов¹, Г.Г. Катрецкая¹, М.В. Мельникова¹, А.С. Мелехова¹,
Ю.О. Соколова^{1,2,*}

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

² ФГБУН «Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова» РАН
194223, Российская Федерация, Санкт-Петербург, пр. Тореза, 44

Токсическое поражение разных тканей организма сопровождается дистрофическими и некротическими процессами. Нервная система организма наиболее подвержена влиянию экзогенных веществ как химической, так и биологической природы. Дистрофия является сложным патологическим процессом, в основе которого лежит нарушение питания клеток, ведущее к возрастным, структурным изменениям и нейродегенерации. При токсических поражениях гибель клеток может происходить путём как некроза, так и апоптоза.

Ключевые слова: токсическое поражение, нервная системы, дистрофия, апоптоз

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: работа выполнена в соответствии с тематическим планом прикладных научно-исследовательских работ по гос. заданию ФГБУ «НКЦТ им. С.Н. Голикова» ФМБА России и при поддержке госзадания ИЭФБ РАН № 075-00264-24-00.

Для цитирования: Гайкова О.Н., Козлов А.А., Катрецкая Г.Г., Мельникова М.В., Мелехова А.С., Соколова Ю.О., Бажанова Е.Д. Морфологические изменения головного мозга при токсическом поражении. *Биомедицина*. 2024;20(3):28–31. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-3-28-31>

Поступила 15.04.2024

Принята после доработки 02.05.2024

Опубликована 10.09.2024

MORPHOLOGICAL CHANGES IN THE BRAIN DURING TOXIC INJURY

Olga N. Gaikova¹, Alexander A. Kozlov¹, Galina G. Katretskaya¹, Margarita V. Melnikova¹,
Alexandra S. Melekhova¹, Yulia O. Sokolova¹, Elena D. Bazhanova^{1,2,*}

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

² Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences
194223, Russian Federation, Saint Petersburg, Toreza Ave., 44

Toxic damage to various tissues of the body is accompanied by dystrophic and necrotic processes. The nervous system is most susceptible to the influence of exogenous substances both of a chemical and biological nature. Dystrophy is a complex pathological process, which is based on a violation of cell nutrition, leading to age-related and structural changes, as well as neurodegeneration. In toxic lesions, cell death can occur through either necrosis or apoptosis.

Keywords: toxic damage, nervous system, dystrophy, apoptosis

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

Funding: the work was carried out in accordance with the thematic plan of applied research work on the state assignment of the Golikov Research Clinical Center of Toxicology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia and with the support of the state assignment of the Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences No. 075-00264-24-00.

For citation: Gaikova O.N., Kozlov A.A., Katretskaya G.G., Melnikova M.V., Melekhova A.S., Sokolova Yu.O., Bazhanova E.D. Morphological Changes in the Brain During Toxic Injury. *Journal Biomed.* 2024;20(3):28–31. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-3-28-31>

Submitted 15.04.2024

Revised 02.05.2024

Published 10.09.2024

Токсическое поражение нервной системы, как и других тканей организма, проявляется в основном дистрофическими и некротическими процессами. Ранее токсические невропатии и поражения головного мозга встречались довольно редко, но развитие новых методов лечения, особенно лечения злокачественных новообразований, привело к значительному увеличению случаев токсических невропатий, которые требуют своевременной диагностики и лечения [8].

Морфология и патологические процессы в нервной системе значительно отличаются от общепатологических процессов в других органах и системах человека. Головной мозг и нервная система в целом являются наиболее уязвимыми объектами воздействия как химических, так и биологических патологических агентов.

Из всех видов клеточных дистрофий, указанных в общем курсе патологической анатомии, актуальной для нервной системы является пигментная дистрофия или накопление липофусцина [2, 3]. Традиционно оно считалось вторичным следствием процесса старения, связанного с различными нейродегенеративными расстройствами. Однако новые данные указывают на активную роль агрегатов липофусцина в процессах старения и нейродегенерации [9].

Специфичным для нервной системы видом дистрофии (гидропической) можно считать острое набухание нейронов, т. к. это процесс обратимый и связан с избыточ-

ным накоплением жидкости в клетке. Если фактор прекращает своё действие, нейрон обретает треугольную форму и восстанавливается, в противном случае происходят необратимые изменения, и он превращается в «клетку-тень» [4].

Другим вариантом дистрофии может быть появление темных нейронов. Однако такие нейроны необязательно скоро погибнут. В некоторых участках коры преобладает только один тип изменений, чаще это острое набухание, но в некоторых полях зрения могут сочетаться и острое набухание, и темные, сморщенные нейроны.

Еще одним видом дистрофии, характерным только для нервной системы, является миелинопатия. В литературе, как отечественной [1], так и зарубежной [5, 7], очень мало внимания уделяется вариантам поражения миелиновых оболочек; как правило, отмечают лишь наличие или отсутствие демиелинизации. Основной причиной демиелинизации чаще всего называют изменение количества олигодендроглицитов [6]. В связи с этим нет и единой морфологической классификации повреждений миелиновой оболочки. Также недостаточно четко определена и патология аксонов.

Среди изменений миелиновой оболочки на микроскопическом уровне (световая и электронная микроскопия) различали разволокнение, расслоение, зернистый распад и гомогенизацию, демиелинизацию и гипермиелинизацию. Периаксональный отёк

и деструкция осевого цилиндра являлись основными типами изменения аксона миелинизированного волокна [1].

Демиелинизация встречается часто при очень многих видах патологии, но эти изменения мало изучены и, как правило, на них не обращают внимания. В лучевой диагностике достаточно распространён диагноз «лейкоареоз»; при сопоставлении посмертных МРТ и морфологических данных выявлено, что одним из морфологических эквивалентов этого МРТ-феномена является разрежение нейропиля, сопровождающееся демиелинизацией.

При токсических поражениях гибель клеток может происходить путём как не-

кроза, так и апоптоза (запрограммированной гибели клеток). Некроз сопровождается воспалительной реакцией и лизисом клетки. Характерным признаком начала апоптоза является конденсация хроматина в ядре клетки, которое затем фрагментируется, каждый фрагмент окружается цитоплазмой и формируется апоптоидное тельце, которые поглощаются макрофагами. Для более точной диагностики апоптоза используется электронная микроскопия и иммуногистохимия, а также метод TUNEL. Программированная гибель клеток определялась при большинстве хронических заболеваний и токсических поражений нервной системы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Гайкова О.Н., Ананьева Н.И., Забродская Ю.М. Морфологические проявления общепатологических процессов в нервной системе. СПб.: Издательская группа «Весь», 2015:158. [Gajkova O.N., Anan'eva N.I., Zabrodskaya Yu.M. *Morfologicheskie proyavleniya obshchepatologicheskikh processov v nervnoy sisteme* [Morphological manifestations of general pathological processes in the nervous system]. Saint Petersburg: "Ves" Publ., 2015:158. (In Russian)].
2. Литвинцев Б.С. Неврологические нарушения при наркомании: принципы диагностики и терапии. СПб.: Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, 2018:167. [Litvintsev B.S. *Nevrologicheskie narusheniya pri narkomanii: principy diagnostiki i terapii* [Neurological disorders in drug addiction: principles of diagnosis and therapy]: Saint Petersburg: Voenno-medicinskaya akademiya imeni S.M. Kirova, 2018:167. (In Russian)].
3. Литвинцев Б.С. Поражения нервной системы при наркомании. СПб.: Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, 2018:160. [Litvintsev B.S. *Porazheniya nervnoy sistemy pri narkomanii* [Damages of the nervous system in drug addiction]. Saint Petersburg: Voenno-medicinskaya akademiya imeni S.M. Kirova, 2018:160. (In Russian)].
4. Петров А.Н., Войцехович К.О., Мелехова А.С., Лисицкий Д.С., Бельская А.В., Михайлова М.В., Гайкова О.Н. Проблемы диагностики нейротоксических нарушений — последствий отравлений веществами судорожного действия. *Вестник Российской военно-медицинской академии*. 2017;3(59): 211–217. [Petrov A.N., Vojtsekhovich K.O., Melekhova A.S., Lisitskiy D.S., Bel'skaya A.V., Mikhajlova M.V., Gajkova O.N. Problemy diagnostiki nejrotoksicheskikh narushenij — posledstvij otravlenij veshchestvami sudorozhnogo dejstviya [Problems of diagnostics of neurotoxic disorders — the effects of convulsive substances poisoning]. *Vestnik Rossijskoj voenno-medicinskoj akademii* [Bulletin of the Russian Military Medical Academy]. 2017;3(59):211–217. (In Russian)].
5. Blümcke I., Thom M., Aronica E., Armstrong D.D., Vinters H.V., Palmini A., Jacques T.S., Avanzini G., Barkovich A.J., Battaglia G., Becker A., Cepeda C., Cendes F., Colombo N., Crino P., Cross J.H., Delalande O., Dubeau F., Duncan J., Guerrini R., Kahane P., Mathern G., Najm I., Ozkara C., Raybaud C., Represa A., Roper S.N., Salamon N., Schulze-Bonhage A., Tassi L., Vezzani A., Spreafico R. The clinic-pathologic spectrum of focal cortical dysplasias: A consensus classification proposed by an ad hoc Task Force of the ILAE Diagnostic Methods Commission. *Epilepsia*. 2011;52(1):158–174. DOI: 10.1111/j.1528-1167.2010.02777.x
6. Kim S.H., Choi J. Pathological classification of focal cortical dysplasia (FCD): Personal comments for well understanding FCD classification. *J. Korean Neurosurg. Soc.* 2019;62(3):288–295. DOI: 10.3340/jkns.2019.0025
7. Lapato A.S., Szu J.I., Hasselmann J.P.C., Khalaj A.J., Binder D.K., Tiwari-Woodruff S.K. Chronic demyelination-induced seizures. *Neuroscience*. 2017;27(346):409–422. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2017.01.035
8. McNeish B.L., Kolb N. Toxic neuropathies. *Continuum (Minneap. Minn.)*. 2023;29(5):1444–1468. DOI: 10.1212/CON.0000000000001343
9. Moreno-García A., Kun A., Calero O., Medina M., Calero M. An overview of the role of lipofuscin in age-related neurodegeneration. *Front. Neurosci.* 2018;12:464. DOI: 10.3389/fnins.2018.00464

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Гайкова Ольга Николаевна, д.м.н., проф., ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова ФМБА России»;
e-mail: olga-gaykova@yandex.ru

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

Козлов Александр Александрович, ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова ФМБА России»;
e-mail: AlexandrK0zlov89@yandex.ru

Alexander A. Kozlov, Golikov Research Clinical Center of Toxicology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: AlexandrK0zlov89@yandex.ru

Катрецкая Галина Геннадьевна, к.м.н., ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова ФМБА России»;
e-mail: dr.katretskaja@yandex.ru

Galina G. Katretskaya, Cand. Sci. (Med.), Golikov Research Clinical Center of Toxicology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: dr.katretskaja@yandex.ru

Мельникова Маргарита Викторовна, ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова ФМБА России»;
e-mail: margarita10108@mail.ru

Margarita V. Melnikova, Golikov Research Clinical Center of Toxicology of the Federal and Medical Biological Agency of Russia;
e-mail: margarita10108@mail.ru

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

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

Соколова Юлия Олеговна, к.б.н., ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова ФМБА России»;
e-mail: yulya_sokolova91@mail.ru

Yulia O. Sokolova, Cand. Sci. (Biol.), Golikov Research Clinical Center of Toxicology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: yulya_sokolova91@mail.ru

Бажанова Елена Давыдовна*, д.б.н., ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова ФМБА России», ФГБУН «Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова» РАН;
e-mail: bazhanovae@mail.ru

Elena D. Bazhanova*, Dr. Sci. (Biol.), Golikov Research Clinical Center of Toxicology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia; Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: bazhanovae@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author



IN SILICO АНАЛИЗ СТАБИЛЬНОСТИ РИБОСОМНОГО БЕЛКА S1 ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ШТАММОВ ПАТОГЕННОГО МИКРООРГАНИЗМА STAPHYLOCOCCUS AUREUS

О.В. Галзитская^{1,2,*}, А.В. Мачулин³, Е.И. Дерюшева⁴

¹ ФГБУН «Институт белка» РАН
142290, Российская Федерация, Московская обл., Пушкино, ул. Институтская, 4

² ФГБУН «Институт теоретической и экспериментальной биофизики» РАН
142290, Российская Федерация, Московская обл., Пушкино, ул. Институтская, 3

³ Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пушчинский научный центр биологических исследований РАН»
142290, Российская Федерация, Московская обл., Пушкино, просп. Науки, 5

⁴ Институт биологического приборостроения ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пушчинский научный центр биологических исследований РАН»
142290, Российская Федерация, Московская обл., Пушкино, просп. Науки, 3

Патогенный микроорганизм *Staphylococcus aureus*, один из представителей семейства стафилококков, способен вырабатывать устойчивость к антибиотикам и антисептикам. Самый большой рибосомный белок S1 из *S. aureus* содержит четыре структурных S1-домена, при этом короткие пептиды, синтезированные на основе его последовательности, обладают амилоидогенными и антимикробными свойствами (антимикробные пептиды). В данной работе *in silico* анализ всех доступных последовательностей рибосомного белка S1 из различных штаммов *S. aureus* позволил выявить остатки, являющиеся характерными для конкретных штаммов. На основе данных сервиса I-Mutant были спрогнозированы изменения стабильности рибосомного белка S1 из различных штаммов *S. aureus*. Полученные результаты в дальнейшем будут использоваться для целенаправленных мутаций при дизайне новых антимикробных пептидов на основе рибосомного белка S1.

Ключевые слова: штаммы *S. aureus*, рибосомный белок S1, стабильность

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Галзитская О.В., Мачулин А.В., Дерюшева Е.И. *In silico* анализ стабильности рибосомного белка S1 из различных штаммов патогенного микроорганизма *Staphylococcus aureus*. *Биомедицина*. 2024;20(3):32–36. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-3-32-36>

Поступила 15.04.2024

Принята после доработки 18.06.2024

Опубликована 10.09.2024

IN SILICO ANALYSIS OF THE STABILITY OF RIBOSOMAL PROTEIN S1 FROM VARIOUS STRAINS OF THE PATHOGENIC MICROORGANISM STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Oxana V. Galzitskaya^{1,2,*}, Andrey V. Machulin³, Evgeniya I. Deryusheva⁴

¹ Institute of Protein Research of the Russian Academy of Sciences
142290, Russian Federation, Moscow Region, Pushchino, Institutskaya Str., 4

² Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of the Russian Academy of Sciences
142290, Russian Federation, Moscow Region, Pushchino, Institutskaya Str., 3

³ Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms of the Federal Research Center
“Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences”
142290, Russian Federation, Moscow Region, Pushchino, Nauki Ave., 5

⁴ Institute of Biological Instrumentation of the Federal Research Center “Pushchino Scientific Center
for Biological Research of the Russian Academy of Sciences”
142290, Russian Federation, Moscow Region, Pushchino, Nauki Ave., 3

The pathogenic microorganism *Staphylococcus aureus*, one of the representatives of the staphylococcus family, is capable of developing resistance to antibiotics and antiseptics. The largest ribosomal protein, S1, from *S. aureus* contains four structural S1 domains, and short peptides synthesized based on its sequence have amyloidogenic and antimicrobial properties (antimicrobial peptides). In this work, *in silico* analysis of all available ribosomal protein S1 sequences from various *S. aureus* strains allowed us to identify residues that are characteristic of specific strains. Based on data from the I-Mutant service, changes in the stability of ribosomal protein S1 from various *S. aureus* strains were predicted. The results obtained will be used in the future for targeted mutations in the design of new antimicrobial peptides based on ribosomal protein S1.

Keywords: *S. aureus* strains, ribosomal protein S1, stability

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

For citation: Galzitskaya O.V., Machulin A.V., Deryusheva E.I. *In silico* Analysis of the Stability of Ribosomal Protein S1 from Various Strains of the Pathogenic Microorganism *Staphylococcus aureus*. *Journal Biomed.* 2024;20(3):32–36. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-3-32-36>

Submitted 15.04.2024

Revised 18.06.2024

Published 10.09.2024

Введение

Золотистый стафилококк, или *Staphylococcus aureus*, — грамположительная болезнетворная бактерия группы стафилококков, которая вызывает гнойно-воспалительные процессы в организме человека. Различные штаммы *S. aureus* вызывают широкий спектр госпитальных инфекций. Штаммы *S. aureus*, устойчивые к метициллину (MRSA), являются наиболее распространённой причиной внутрибольничных инфекций (HA-MRSA) [2]. Антимикробные пептиды являются потенциальной заменой традиционным антибиотикам [4]. Нами был предложен новый класс антимикробных пептидов, основанный на направленной коагрегации пептида, способного формировать фибриллы, с белком-мишенью — рибосомным белком S1. Многофункциональный рибосомный белок S1 является частью 30S субъединицы рибосомы и играет важную роль в инициации

трансляции мРНК, участвует в элонгации, а также выполняет ряд внерибосомных функций. Рибосомный белок S1 из *S. aureus* содержит четыре структурных S1-домена [3]. Ранее нами было показано, что часть последовательностей этих доменов обладает амилоидогенными и антимикробными свойствами против *S. aureus* [1].

Поскольку предполагается, что устойчивость к антибиотикам патогенных микроорганизмов может быть связана с генетическим разнообразием некоторых штаммов бактерий в данной работе, нами было изучено разнообразие рибосомного белка S1 в различных штаммах *S. aureus* для поиска потенциальных мутаций для дизайна новых антимикробных пептидов против MRSA.

Материалы и методы

Для поиска рибосомного белка S1 из различных штаммов патогенного микроорганизма

S. aureus была проанализирована база данных белковых последовательностей UniProt (<https://www.uniprot.org>). Множественное выравнивание найденных последовательностей было осуществлено с помощью сервиса Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>). Анализ стабильности рибосомных белков S1 из различных штаммов *S. aureus* реализован программой I-Mutant (<https://folding.biofold.org/i-mutant/>), позволяющей оценивать изменение стабильности белковой молекулы при точечной замене. Изменение свободной энергии ($\Delta\Delta G$) при мутациях для выбранной аминокислоты определяется как значе-

ние свободной энергии Гиббса мутантного белка за вычетом значения свободной энергии Гиббса белка дикого типа (ккал/моль): $\Delta\Delta G < -0,5$ означает снижение стабильности, $\Delta\Delta G > 0,5$ — увеличение стабильности белка, $-0,5 \leq \Delta\Delta G \leq 0,5$ означает отсутствие влияния мутации на стабильность.

Результаты исследований

Анализ базы UniProt выявил 26 последовательностей рибосомного белка S1 из разных штаммов *S. aureus* (MRSA252, MSSA476, MW2, N315 и др.) длиной от 391 до 398 а.о. Множественное выравнивание последовательностей выявил процент идентичности,

Таблица. Список аминокислотных замен в различных штаммах *S. aureus* и их влияние на стабильность рибосомного белка S1

Table. List of amino acid substitutions in various strains of *S. aureus* and their effect on the stability of ribosomal protein S1

№ а.о.	А.о.	Мутация, а.о.	Штамм с точечной мутацией в рибосомном белке S1 / UniProt ID	-0,5 ≤ ΔΔG ≤ 0,5 означает отсутствие влияния мутации на стабильность G, ккал/моль
60	V	A	<i>S. aureus</i> / A0A7D5PLM8	-0,53
155	R	H	<i>S. aureus</i> / A0A9Q8DJ78	-2,09
162	D	Y	<i>S. aureus</i> / A0A9Q1YFW7	-1,10
198	D	H	<i>S. aureus</i> / A0A389U594; <i>S. subsp. aureus</i> ST228 / A0A7U7IEJ7; <i>S. aureus</i> strain N315/Q7A5J0; <i>S. aureus</i> strain Mu50/ ATCC 700699/ Q99U14	-1,38
251	D	V	<i>S. aureus</i> / A0A9N8FC94	-2,03
277	H	R	<i>S. aureus</i> / A0A9Q1YFW7; <i>S. aureus</i> / A0A844QQC7; <i>S. aureus</i> / A0A224AXC5	-0,09
281	V	D	<i>S. aureus</i> MN8 / A0A0E1X765; <i>S. aureus</i> / A0A113GNS0; <i>S. aureus</i> 55/2053 / A0A8D9SLW7; <i>S. aureus</i> MRSA252 / Q6GGT5	-1,34
300	P	S	<i>S. aureus</i> / A0A9N8FC94; <i>S. aureus</i> / A0A0U1MMH7	-1,90
338	E	K	<i>S. aureus</i> / A0A844QQC7	-0,93
349	A	E	<i>S. aureus</i> / A0A6G4QHN1	-0,70
370	N	S	<i>S. aureus</i> / A0A9Q1YFW7; <i>S. aureus</i> / A0A9N8FC94; <i>S. aureus</i> / A0A844QQC7; <i>S. aureus</i> / A0A224AXC5; <i>S. aureus</i> / A0A0U1MMH7; <i>S. aureus</i> MN8 / A0A0E1X765; <i>S. aureus</i> / A0A113GNS0; <i>S. aureus</i> / A0A0D1H9E6; <i>S. aureus</i> 55/2053 / A0A8D9SLW7; <i>S. aureus</i> MRSA252 / Q6GGT5	0,55

равный 98–100%. Аминокислотные замены по исследуемому набору последовательностей найдены в 11 положениях (табл.).

Так, например, у штамма MRSA252 (UniProt ID: Q6GGT5) в положении 281 находится остаток Asp (вместо 281Val — в других штаммах). Для этого же штамма в последовательности белка S1 характерна также замена 370Ser по сравнению со штаммами MSSA476, штаммом N315, штаммом MW2 и штаммом Mu50/ATCC700699 (370N). Аминокислота в положении 198 (Asp или His) сильно зависит от штамма *S. aureus*. Отметим, что в последовательности штамма MRSA252 (UniProt ID: Q6GGT5), у которого остаток 281Asp расположен в положении, соответствующем амилоидогенному участку [4], на месте 281Val у штамма MSSA476 (UniProt ID: Q6G987). Анализ выявленных замен с помощью I-Mutant показал, что 10 (из 11) из них в разной степени влияют на стабильность исследуемых бел-

ков. Так, замена в положении 281Val (N315, ST228, Mu50) на Asp (MRSA252, MN8, 55/2053) значительно уменьшает стабильность белков ($\Delta\Delta G = -1,34$). Замена 370Ser (MRSA252, MN8, 55/2053) по сравнению с другими последовательностями приводит к небольшому увеличению стабильности белков ($\Delta\Delta G = 0,55$).

Выводы

Таким образом, анализ аминокислотных последовательностей различных штаммов *S. aureus* позволил выявить остатки, являющиеся характерными для конкретных штаммов. Для найденных мутаций были спрогнозированы изменения стабильности рибосомного белка S1 из различных штаммов *S. aureus*. Дальнейший анализ найденных замен будет использован для дизайна новых антимикробных пептидов на основе рибосомного белка S1 против резистентных штаммов *S. aureus*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

- Galzitckaya O.V., Kurpe S.R., Panfilov A.V., Glyakina A.V., Grishin S.Y., Kochetov A.P., Deryusheva E.I., Machulin A.V., Kravchenko S.V., Domnin P.A., Surin A.K., Azev V.N., Ermolaeva S.A. Amyloidogenic peptides: New class of antimicrobial peptides with the novel mechanism of activity. *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23(10):5463. DOI: 10.3390/ijms23105463
- Kourtis A.P., Hatfield K., Baggs J., Mu Y., See I., Epton E., Nadle J., Kainer M.A., Dumyati G., Petit S., Ray S.M.; Emerging Infections Program MRSA author group; Ham D., Capers C., Ewing H., Coffin N., McDonald L.C., Jernigan J., Cardo D. Vital signs: Epidemiology and recent trends in methicillin-resistant and in methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bloodstream infections — United States. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 2019;68(9):214–219. DOI: 10.15585/mmwr.mm6809e1
- Machulin A., Deryusheva E.I., Selivanova O.M., Galzitckaya O.V. The number of domains in the ribosomal protein S1 as a hallmark of the phylogenetic grouping of bacteria. *PLoS One.* 2019;14(8):e0221370. DOI: 10.1371/journal.pone.0221370
- Sierra J.M., Viñas M. Future prospects for antimicrobial peptide development: Peptidomimetics and antimicrobial combinations. *Expert Opin. Drug Discov.* 2021;16(6):601–604. DOI: 10.1080/17460441.2021.1892072

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Галзитская Оксана Валериановна*, д.ф.-м.н., ФГБУН «Институт белка» РАН, ФГБУН «Институт теоретической и экспериментальной биофизики» РАН;
e-mail: ogalzit@vega.protres.ru

Oxana V. Galzitckaya*, Dr. Sci. (Phys.-Math.), Institute of Protein Research of the Russian Academy of Sciences, Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: ogalzit@vega.protres.ru

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

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

Дерюшева Евгения Игоревна, к.ф.-м.н., Институт биологического приборостроения ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»;
e-mail: evgenia.deryusheva@gmail.com

Evgeniya I. Deryusheva, Cand. Sci. (Phys.-Math.), Institute of Biological Instrumentation of the Federal Research Center “Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences”;
e-mail: evgenia.deryusheva@gmail.com

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

<https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-3-37-46>



СНИЖЕНИЕ КАРДИТОКСИЧНОСТИ ДАУНОРУБИЦИНА ПУТЁМ КОНЪЮГАЦИИ С ПРИРОДНЫМИ СЕСКВИТЕРПЕНОВЫМИ ЛАКТОНАМИ

А.А. Глоба*, А.В. Семаков, С.А. Пухов, С.В. Афанасьева, Л.В. Аникина

*Институт физиологически активных веществ, ФГБУН «Федеральный исследовательский центр
проблем химической физики и медицинской химии» РАН
142432, Российская Федерация, Московская обл., Черноголовка, Северный пр., 1*

В работе приведены результаты гистологического исследования кардиотоксичности конъюгатов даунорубицина с дегидрокостуслактоном и эпоксиизоалантолактоном на половозрелых мышцах-самцах линии C57BL/6. Исследовано влияние конъюгатов на морфологию кардиомиоцитов и структуру миокарда левого желудочка мышей.

Ключевые слова: даунорубицин, кардиотоксичность, сесквитерпеновые лактоны, конъюгаты

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: исследование выполнено в рамках государственного задания ИФАВ РАН (тема № FFSG-2024-0021). Конъюгаты даунорубицина с сесквитерпеновыми лактонами были синтезированы в рамках проекта Российского научного фонда № 19-73-00343.

Благодарности: авторы выражают благодарность ЦДИ ИФАВ РАН за предоставление гистологического оборудования для изготовления и анализа гистологических препаратов сердца.

Для цитирования: Глоба А.А., Семаков А.В., Пухов С.А., Афанасьева С.В., Аникина Л.В. Снижение кардиотоксичности даунорубицина путём конъюгации с природными сесквитерпеновыми лактонами. *Биомедицина*. 2024;20(3):37–46. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-3-37-46>

Поступила 10.04.2024

Принята после доработки 29.06.2024

Опубликована 10.09.2024

REDUCING THE CARDIOTOXICITY OF DAUNORUBICIN BY CONJUGATION WITH NATURAL SESQUITERPENE LACTONES

Anastasiya A. Globa*, Aleksey V. Semakov, Sergey A. Pukhov,
Svetlana V. Afanasyeva, Lada V. Anikina

*Institute of Physiologically Active Compounds, Federal Research Center of Problems of Chemical Physics
and Medicinal Chemistry of the Russian Academy of Sciences
142432, Russian Federation, Moscow Region, Chernogolovka, Severny Passage, 1*

We present the results of a histological study into the cardiotoxicity of conjugates of daunorubicin with dehydrocostus lactone and epoxyisoalantolactone in mature male mice of the C57BL/6 line. The effect of conjugates on the morphology of cardiomyocytes and the structure of the left ventricular myocardium in mice was studied.

Keywords: daunorubicin, cardiotoxicity, sesquiterpene lactones, conjugates

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

Funding: the study was supported by the budget of the IPAC RAS State Target-2024 (topic No. FFSG-2024-0021). Conjugates of daunorubicin with sesquiterpene lactones were synthesized within the framework of the Russian Science Foundation project No. 19-73-00343.

Acknowledgments: the authors express their gratitude to the Center for Preclinical Tests of the Institute of Physiologically Active Compounds of the Russian Academy of Sciences for providing histological equipment for the preparation and analysis of histological preparations of the heart.

For citation: Globa A.A., Semakov A.V., Pukhov S.A., Afanasyeva S.V., Anikina L.V. Reducing the Cardio-toxicity of Daunorubicin by Conjugation with Natural Sesquiterpene Lactones. *Journal Biomed.* 2024;20(3): 37–46. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-3-37-46>

Submitted 10.04.2024

Revised 29.06.2024

Published 10.09.2024

Введение

Антрациклиновые антибиотики (АА) благодаря высокой эффективности и сегодня остаются востребованными в схемах лечения пациентов с солидными и гематологическими опухолями. Однако их применение сопровождается побочными эффектами, наиболее опасным из которых является кумулятивная дозозависимая кардиотоксичность [4, 7].

В настоящее время считают, что кардиотоксичность АА неразрывно связана с одним из основных механизмов их действия — взаимодействием с топоизомеразой II типа (в случае кардиомиоцитов — изоформой II β), которое приводит к образованию поперечных сшивок или к одно- и двухнитевым разрывам ДНК. Это вызывает нарушение синтеза различных белков, в т. ч. сократительного аппарата кардиомиоцитов, дегенеративные изменения и гибель клеток паренхимы и стромы. Следствием повреждения ядерной и митохондриальной ДНК также является избыточная продукция АФК и окислительный стресс, хотя ранее полагали, что основные пути образования АФК связаны с обменом электронов между хиноновой частью АА и молекулами-донорами электронов, например кислородом, и/или с формированием комплексов «АА – железо» и окислительно-восстановительными реакциями [3].

Для снижения побочных эффектов химиотерапии используют различные подходы,

один из которых — применение кардиопротекторов, например дексразоксана. Этот препарат имеет несколько механизмов действия [9]: взаимодействует с топоизомеразой II β и изменяет её конфигурацию, предотвращая связывание с АА и предупреждая повреждение ДНК [11]; связывает железо, предотвращая формирование комплекса с АА и, соответственно, снижает количество АФК [12]. И хотя доказано уменьшение окислительного стресса и снижение рисков развития сердечной недостаточности во время курса химиотерапии и в течение нескольких месяцев после лечения, дексразоксан не останавливает развитие антрациклин-индуцированной кардиомиопатии [9] и снижает эффективность АА [15].

В настоящее время актуальной проблемой является не только поиск новых химиотерапевтических средств, но и разработка подходов к снижению побочных эффектов известных противоопухолевых препаратов. Одним из таких подходов является модификация АА природными соединениями с различными видами биологической активности, в т. ч. антипролиферативной.

Объектами исследования являются конъюгаты даунорубицина (ОНОПБ, Омутнинск, Россия) с природными сесквитерпеновыми лактонами — эпоксиизоалантолактоном (DNR-L04) и дегидрокостуслактоном (DNR-SL62), синтезированные аза-реакцией Михаэля — присоединением атома азота даунозамина к лактону по активирован-

ной экзометиленовой связи (рис. 1) [14]. Эти конъюгаты были выбраны для оценки кардиотоксичности *in vivo* на основе ранее полученных данных [13]; *in vitro* они показали сравнимую с DNR цитотоксичность, но по-разному влияли на клеточный цикл. В то время как конъюгат DNR-SL62 сохранял сходный с даунорубицином эффект — арест клеток в G_2/M фазе, производное DNR-L04 не показало подобных свойств.

Цель данной работы заключалась в сравнении кардиотоксичности даунорубицина (DNR) и двух его конъюгатов с сесквитерпеновыми лактонами при помощи гистологического исследования.

Материалы и методы

Эксперимент, одобренный локальной Комиссией по биоэтике ИФАВ РАН, был выполнен на 56 мышах-самцах линии C57BL/6 массой 25–30 г и возрастом 3 мес. на начало исследования. Животные были разведены в институтском виварии и содержались в стандартных условиях с 12-часовым режимом «день/ночь» и неограниченным доступом к пище и воде. Число особей в одной клетке не превышало 7. Все манипуляции с животными выполнены в соответствии

с принципами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях [10].

Были сформированы 4 группы по 14 особей: группа 1 — контроль с физ. р-ром (интактные животные); группа 2 получала DNR (препарат сравнения); группы 3 и 4 получали препараты DNR-SL62 и DNR-L04 соответственно. Соединения вводили внутривентриально в течение 4 недель один раз в неделю до кумулятивной дозы: DNR — 5 мг/кг, конъюгаты — 20 мг/кг, а физ. р-р — в объёме, эквивалентном массе животного и не превышающем 0,5 мл. По 7 животных из каждой группы выводили из эксперимента через 1 неделю после последнего введения препарата (острая фаза лечения) и через 13 недель после последнего введения (восстановительный период).

Для гистологического исследования фрагмент левого желудочка фиксировали в 10%-ном нейтральном забуференном формалине («BioVitrum», Россия) и подвергали гистологической проводке на основе реагента IsoPrep («BioVitrum», Россия). На ротационном микротоме Leica RM2265 получали срезы толщиной 5 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином

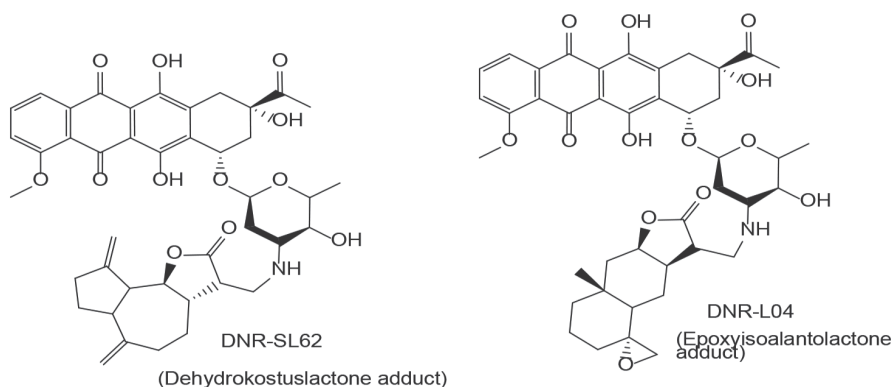


Рис. 1. Структурные формулы конъюгатов даунорубицина.
Fig. 1. Structural formulas of daunorubicin conjugates.

(«Bio Vitrum», Россия) по стандартному протоколу [5]. Гистологические препараты изучали и фотографировали на большом и малом увеличениях при помощи светового микроскопа Leica DM2500 (Германия), оснащённого системой видеорегистрации и компьютерным программным обеспечением «Leica Application Suite 3.8».

Для количественной оценки влияния конъюгатов на структуру миокарда левого желудочка проводили компьютерное морфометрическое исследование методом точечного счета в 10–15 случайных полях зрения (1 мм²) при помощи программы обработки графических изображений ImageJ 1.5. Считали удельные объёмы структурных компонентов паренхимы (кардиомиоцитов, ядер кардиомиоцитов, перинуклеарного пространства кардиомиоцитов) и стромы (соединительной ткани и кровеносных сосудов) миокарда [1]. На основе полученных данных рассчитывали паренхиматозно-стромальное отношение.

Для расчёта средних значений измеряли диаметры капилляров, кардиомиоцитов, их ядер и перинуклеарного пространства на продольных срезах на уровне эндотелиоцита капилляра и ядра кардиомиоцита. Измеряли толщину сосудистой стенки и радиус просвета артериол и венул. На основе измерений рассчитывали параметры, количественно характеризующие взаимоотношение паренхимы миокарда левого желудочка и сосудов микроциркуляторного русла, таких как трофический индекс, зона перикапиллярной диффузии (ЗПКД) и индекс Керногана для артериол и венул [1].

Статистическую обработку данных проводили в программе IBM SPSS Statistica 20.0 с использованием непараметрического критерия Манна — Уитни. Количественные данные выражали как медиану, 25-й и 75-й квартили (Me, Q₂₅ и Q₇₅ соответственно). Оцениваемые показатели считали статистически достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

При микроскопии препаратов интактных животных в острой фазе лечения и после восстановительного периода было подтверждено нормальное строение миокарда левого желудочка без признаков патологических изменений, таких как липоматоз, фиброз, воспаление и ремоделирование миокарда (рис. 2).

У животных группы 2 в острой фазе лечения не было замечено выраженных признаков развивающегося фиброза и липоматоза, однако визуально наблюдали увеличение клеточности стромы миокарда и изменение морфологии кардиомиоцитов. Были обнаружены вакуолизация цитоплазмы кардиомиоцитов, кардиомиоциты с признаками атрофии и гипертрофии, выраженное расширение перинуклеарного пространства, а также дезорганизация миофибрилл в отдельных саркомерах. Данные эффекты являются типичными для АА и связаны с их основным механизмом действия, они носят очаговый или мозаичный характер и подробно описаны в работах [2, 6], а их выраженность зависит от дозы препарата. Наряду с нарушением структуры сократительного аппарата особый интерес представляет расширение перинуклеарного пространства, которое в данном случае является перинуклеарным отёком, связанным с дисфункцией ионных каналов эндоплазматического ретикулума и митохондрий, и при избыточном накоплении жидкости способствует дезорганизации миофибрилл. По завершении 13 недель восстановительного периода морфология части кардиомиоцитов возвращается практически к исходному состоянию, однако в большей части клеток определяются дезорганизованные миофибриллы и дистрофические изменения (рис. 2).

В группах 3 и 4 морфология миокарда левого желудочка в острой фазе лечения имеет сходства с таковой для группы 2, но дистрофические изменения кардиомиоцитов, расширение перинуклеарного пространства

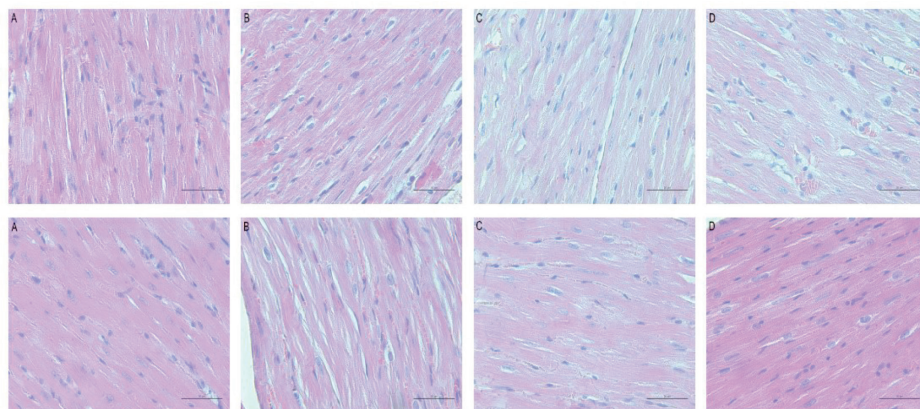


Рис. 2. Фотографии миокарда левого желудочка мышей-самцов линии C57BL/6; окраска гематоксилином и эозином, ув. $\times 400$. Обозначения: A — интактные животные, B — DNR, C — DNR-SL62, D — DNR-L04. Верхний ряд — острая фаза лечения, нижний ряд — восстановительный период.

Fig. 2. Photographs of the left ventricle myocardium of male C57BL/6 mice; hematoxylin and eosin staining, magn. $\times 400$. Indications: A — intact animals, B — DNR, C — DNR-SL62, D — DNR-L04. The top row is the acute phase of the treatment; the bottom row is the recovery period.

и дезорганизация миофибрилл выражены меньше. После восстановительного периода в группах 3 и 4 структура миофибрилл кардиомиоцитов частично восстанавливается и визуально становится сходной с таковой для интактных животных (рис. 2).

Эти наблюдения подтверждают наличие антрациклин-индуцированного повреждения сердца в опытных группах, причём из двух тестируемых соединений DNR-SL62 показывает большее сходство с DNR по влиянию на морфологию кардиомиоцитов и миокарда, чем DNR-L04. Такой эффект может быть связан с тем, что конъюгат с дегидрокостуслактоном в различных экспериментах *in vitro* имел самые близкие к даунорубицину показатели и, вероятно, в большей степени сохраняет основные механизмы цитотоксического и кардиотоксического действия исходного АА [14].

Поскольку описанные выше изменения характерны для антрациклин-индуцированного повреждения сердца и присутствуют во всех опытных группах, было проведено компьютерное морфометрическое исследование с целью определения количественной характеристики влияния тестируемых конъюгатов на структуру миокарда.

Результаты сравнения представлены в табл. 1–4.

Установлено, что в острой фазе лечения DNR заметно влияет на структуру миокарда левого желудочка. Из представленных в табл. 1 данных видно, что в основном изменяются такие параметры, как удельный объём кардиомиоцитов и соединительной ткани, а также перинуклеарное пространство, увеличение которого подтверждает его значимость при микроскопии. Установлено, что оба конъюгата влияют на структуру миокарда, но не так выражено, как DNR. Во всех опытных группах изменяется соотношение паренхимы и стромы, а паренхиматозно-стромальное отношение в сравнении с группой 1 уменьшается.

После восстановительного периода (табл. 2) было установлено, что в группе 2 практически не изменяются параметры, для которых наблюдали выраженные изменения в острой фазе, за исключением уменьшения удельного объёма ядер кардиомиоцитов. Это может свидетельствовать о протекании в организме животных восстановительных и/или компенсаторно-приспособительных процессов. В то же

Таблица 1. Удельные объёмы компонентов паренхимы и стромы миокарда левого желудочка мышей линии C57BL/6 в острой фазе лечения, Me (Q_{25} ; Q_{75}), мкм³/мкм³

Table 1. Specific component volumes of the parenchyma and stroma of the left ventricle myocardium in C57BL/6 mice in the acute phase of treatment, Me (Q_{25} ; Q_{75}), $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$

Показатели	Контроль (группа 1)	DNR (группа 2)	DNR-SL62 (группа 3)	DNR-L04 (группа 4)
Кардиомиоциты	79,30 (78,71; 81,22)	71,38 (66,83; 73,77)*	75,51 (71,97; 77,63)*	78,41 (76,87; 79,05)* #
Ядра кардиомиоцитов	3,83 (3,24; 4,12)	4,21 (3,49; 5,09)	4,52 (4,06; 6,23)	4,64 (4,43; 4,94)*
Перинуклеарное пространство кардиомиоцитов	0,06 (0,00; 0,17)	0,85 (0,67; 1,57)*	0,00 (0,00; 0,01) ^ф	0,00 (0,00; 0,02) ^ф
Соединительная ткань	5,79 (4,74; 6,4)	13,27 (11,34; 15,07)*	6,75 (5,95; 7,97) ^ф	6,02 (5,43; 6,68) ^ф
Кровеносные сосуды	10,76 (9,96; 11,3)	10,82 (8,77; 12,73)	13,56 (11,3; 14,84)*	11,21 (10,27; 12,28)
Паренхима	83,47 (82,55; 84,22)	77,85 (72,51; 79,27)*	79,99 (77,59; 81,97)*	83,07 (82,01; 83,46) ^ф
Строма	16,58 (14,95; 17,39)	22,75 (20,73; 27,49)*	20,01 (18,03; 22,41)*	16,93 (16,54; 18,04) ^ф
Паренхиматозно-стромальное отношение, мкм ⁶ /мкм ⁶	5,03 (4,75; 5,65)	3,45 (2,64; 3,82)*	4,02 (3,46; 4,57)*	4,91 (4,55; 5,05) ^ф

Примечание: удельные объёмы для удобства представления данных были умножены на 100. * — статистически достоверные отличия от контрольной группы, $p < 0,05$; # — статистически достоверные отличия от группы DNR, $p < 0,05$.

Note: for ease of data presentation, specific volumes were multiplied by 100. * — statistically significant differences from the control group, $p < 0.05$; # — statistically significant differences from the DNR group, $p < 0.05$.

Таблица 2. Удельные объёмы компонентов паренхимы и стромы миокарда левого желудочка мышей линии C57BL/6 после восстановительного периода, Me (Q_{25} ; Q_{75}), мкм³/мкм³

Table 2. Specific component volumes of the parenchyma and stroma of the left ventricle myocardium in C57BL/6 mice after the recovery period, Me (Q_{25} ; Q_{75}), $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$

Показатели	Контроль (группа 1)	DNR (группа 2)	DNR-SL62 (группа 3)	DNR-L04 (группа 4)
Кардиомиоциты	74,75 (74,45; 76,17)	68,35 (66,35; 69,33)*	70,57 (68,35; 73,79)*	71,86 (70,6; 73,8)* #
Ядра кардиомиоцитов	4,15 (3,49; 4,89)	2,63 (2,13; 3,16)*	3,26 (2,96; 3,48)*	3,91 (2,47; 4,29)
Перинуклеарное пространство кардиомиоцитов	0,1 (0,04; 0,12)	0,67 (0,46; 1,0)*	0,00 (0,00; 0,10) ^ф ◊	0,13 (0,03; 0,19) ^ф
Соединительная ткань	7,94 (6,78; 8,41)	13,41 (12,05; 14,42)*	12,42 (10,08; 14,03)*	12,94 (12,57; 13,11)*
Кровеносные сосуды	12,46 (10,95; 13,71)	14,3 (12,63; 16,82)*	13,72 (12,70; 15,12)	11,43 (9,37; 14,2)
Паренхима	79,21 (78,01; 80,58)	71,05 (68,94; 75,32)*	73,47 (71,32; 77,09)*	76,01 (73,18; 77,74)* #
Строма	20,79 (19,35; 21,91)	27,71 (24,68; 31,29)*	26,06 (22,77; 28,68)*	23,99 (22,26; 26,89)* #
Паренхиматозно-стромальное отношение, мкм ⁶ /мкм ⁶	3,81 (3,56; 4,16)	2,59 (2,2; 3,05)*	2,82 (2,49; 3,39)*	3,17 (2,72; 3,49)* #

Примечание: удельные объёмы для удобства представления данных были умножены на 100. * — статистически достоверные отличия от контрольной группы, $p < 0,05$; # — статистически достоверные отличия от группы DNR, $p < 0,05$; ◊ — статистически достоверные различия между конъюгатами, $p < 0,05$.

Note: for ease of data presentation, specific volumes were multiplied by 100. * — statistically significant differences from the control group, $p < 0.05$; # — statistically significant differences from the DNR group, $p < 0.05$; ◊ — statistically significant differences between conjugates, $p < 0.05$.

время в группах 3 и 4 уменьшение удельного объёма кардиомиоцитов и увеличение удельного объёма соединительной ткани было более выражено по сравнению с аналогичными параметрами для острой фазы лечения и для группы 2. Возможно, это связано с тем, что в конъюгатах фрагмент лактона связан с атомом азота даунозамина — одним из сайтов связывания Р-гликопротеина, ответственного за выведение ксенобиотиков из клеток и развитие резистентности опухолей к химиотерапии. Теоретически исследуемые соединения могут дольше находиться в клетках и воздействовать на них, особенно в кардиомиоцитах, с учётом низкой экспрессии в них Р-гликопротеина в сравнении с эпителиальными клетками [8]. В целом характеризующие структуру миокарда данные для мышей группы 4 ближе к таковым для интактных животных, а в случае группы 3 — к показателям группы мышей с DNR.

Поскольку установлено влияние соединений на кардиомиоциты и выявлено увеличение удельного объёма перинуклеарного пространства в группе 1, то был измерен

диаметр кардиомиоцитов, а также их ядер и перинуклеарного пространства.

В ходе исследования (табл. 3) обнаружено, что в острой фазе лечения диаметры кардиомиоцитов в опытных группах не отличаются от таковых у интактных животных. Однако обнаружено статистически достоверное расширение перинуклеарного пространства в группе 1, а также видно, что его наличие «компенсирует» атрофические изменения, характерные для антрациклиновой кардиомиопатии. Это подтверждено данными восстановительного периода — показано статистически достоверное уменьшение диаметра как перинуклеарного пространства, так и кардиомиоцитов. Уменьшение диаметра кардиомиоцитов установлено также в группе 3, что свидетельствует о схожем с исходным АА влиянии DNR-SL62 на морфологию кардиомиоцитов.

В связи с тем что АА воздействуют на микроциркуляторное русло, способствуя ремоделированию соединительной ткани и развитию ишемии миокарда (что ещё больше увеличивает риск развития хронической сердечной недостаточности), были рассчитаны

Таблица 3. Средний диаметр кардиомиоцитов миокарда левого желудочка мышей линии C57BL/6, Me (Q_{25} ; Q_{75}), мкм
Table 3. Average diameter of cardiomyocytes of the left ventricular myocardium in C57BL/6 mice, Me (Q_{25} ; Q_{75}), μm

Показатели	Контроль (группа 1)	DNR (группа 2)	DNR-SL62 (группа 3)	DNR-L04 (группа 4)
Острая фаза лечения				
Кардиомиоциты	8,28 (7,69; 9,09)	8,17 (8,06; 8,26)	8,0 (7,41; 8,48)	8,4 (8,8; 8,69)
Ядра кардиомиоцитов	4,92 (4,66; 5,28)	4,77 (4,74; 4,94)	4,67 (4,38; 4,8)	4,83 (4,63; 4,99)
Перинуклеарное пространство кардиомиоцитов	0,04 (0,00; 0,05)	0,61 (0,52; 0,73)*	0,13 (0,03; 0,24) [◇]	0,00 (0,00; 0,08) [#]
Восстановительный период				
Кардиомиоциты	8,55 (8,33; 8,93)	7,64 (7,48; 8,19)*	7,66 (7,48; 8,1)*	7,94 (7,76; 8,21)
Ядра кардиомиоцитов	5,17 (5,11; 5,41)	4,3 (4,24; 4,52)*	4,7 (4,44; 4,84)*	4,49 (4,46; 4,66)*
Перинуклеарное пространство кардиомиоцитов	0,06 (0,02; 0,11)	0,23 (0,19; 0,26)*	0,12 (0,05; 0,22) [#]	0,06 (0,02; 0,11) [#]

Примечание: * — статистически достоверные отличия от контрольной группы, $p < 0,05$; # — статистически достоверные отличия от группы DNR, $p < 0,05$; ◇ — статистически достоверные различия между конъюгатами, $p < 0,05$.

Note: * — statistically significant differences from the control group, $p < 0.05$; # — statistically significant differences from the DNR group, $p < 0.05$; ◇ — statistically significant differences between the conjugates, $p < 0.05$.

Таблица 4. Параметры, количественно характеризующие микроциркуляторное русло миокарда левого желудочка мышей линии C57BL/6, Me (Q_{25} ; Q_{75})

Table 4. Parameters quantitatively characterizing the microvasculature of the left ventricle myocardium in C57BL/6 mice, Me (Q_{25} ; Q_{75})

Показатели	Контроль (группа 1)	DNR (группа 2)	DNR-SL62 (группа 3)	DNR-L04 (группа 4)
Острая фаза лечения				
Капилляры, мкм	5,3 (5,2; 5,44)	5,13 (5,04; 5,15)*	5,15 (5,13; 5,22)* [◊]	5,25 (5,21; 5,28) [#]
Трофический индекс, мкм ⁹ /мкм ⁶	0,159 (0,129; 0,18)	0,072 (0,068; 0,089)*	0,066 (0,063; 0,081)* [◊]	0,095 (0,082; 0,161) [#]
ЗПКД, мкм/мкм ³	47,53 (40,5; 55,2)	99,61 (79,3; 111,94)*	107,21 (91,1; 111,32)* [◊]	73,63 (62,91; 87,53)* [#]
Индекс Керногана артериол, мкм/мкм	0,273 (0,248; 0,3)	0,36 (0,283; 0,385)	0,338 (0,263; 0,375)	0,32 (0,28; 0,33)
Индекс Керногана венул, мкм/мкм	0,177 (0,171; 0,19)	0,203 (0,179; 0,211)	0,194 (0,183; 0,2)	0,192 (0,172; 0,207)
Восстановительный период				
Капилляры, мкм	5,39 (5,32; 5,5)	5,06 (5,0; 5,09)*	5,18 (5,14; 5,22)* ^{#◊}	5,24 (5,21; 5,29)* [#]
Трофический индекс, мкм ⁹ /мкм ⁶	0,105 (0,103; 0,108)	0,09 (0,086; 0,097)*	0,098 (0,09; 0,101)* [◊]	0,107 (0,103; 0,115) [#]
ЗПКД, мкм/мкм ³	64,98 (63,38; 68,26)	79,25 (70,52; 86,76)*	73,08 (69,87; 84,58)* [◊]	62,48 (59,28; 64,62) [#]
Индекс Керногана артериол, мкм/мкм	0,296 (0,259; 0,324)	0,392 (0,38; 0,408)*	0,379 (0,35; 0,394)*	0,354 (0,332; 0,36)* [#]
Индекс Керногана венул, мкм/мкм	0,174 (0,166; 0,197)	0,188 (0,184; 0,196)	0,184 (0,181; 0,189)	0,183 (0,176; 0,189)

Примечание: * — статистически достоверные отличия от контрольной группы, $p < 0,05$; # — статистически достоверные отличия от группы DNR, $p < 0,05$; ◊ — статистически достоверные различия между конъюгатами, $p < 0,05$.

Note: * — statistically significant differences from the control group, $p < 0.05$; # — statistically significant differences from the DNR group, $p < 0.05$; ◊ — statistically significant differences between the conjugates, $p < 0.05$.

параметры, которые могут служить количественной характеристикой состояния сосудов микроциркуляторного русла.

Из представленных данных видно (табл. 4), что средний диаметр капилляров уменьшается относительно контроля во всех опытных группах как в острой фазе лечения, так и после восстановительного периода. В сочетании с уменьшением трофического индекса и увеличением ЗПКД этот факт свидетельствует об уменьшении количества (плотности) капилляров и снижении трофики миокарда. Установлено, что в большей степени сам DNR, а в меньшей — его конъюгаты влияют на артериолы. Об этом свидетельствует увеличение индекса Керногана для артериол, который после восстанови-

тельного периода становится статистически значимым показателем.

Закключение

Конъюгат даунорубицина с эпоксиизоанттолактоном (DNR-L04) показал меньшую кардиотоксичность, чем даунорубин, что в сочетании с его высокой цитотоксичностью *in vitro* позволяет рассматривать его в качестве соединения-лидера для разработки новых противоопухолевых средств на основе даунорубицина. Конъюгат даунорубицина с дегидрокостуслактоном (DNR-SL62) по кардиотоксичности приближается к даунорубину, что было установлено по результатам микроскопического и морфометрического исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Автандилов Г.Г. *Медицинская морфометрия. Руководство*. М.: Медицина, 1990:384. [Avtandilov G.G. *Medicinskaya morfometriya. Rukovodstvo [Medical morphometry. Guide]*. Moscow: Medicina Publ., 1990:384. (In Russian)].
2. Арчакова Л.И., Новаковская С.А. Клеточные механизмы антрациклиновой кардиомиопатии при действии антибиотика доксорубина. *Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия медицинских наук*. 2017;(1):83–89. [Archakova L.I., Novakovskaya S.A. Kletochnye mexanizmy antraciklinovoy kardiomiopatii pri dejstvii antibiotika doksorubina [Cell mechanisms of anthracycline cardiomyopathy under antibiotic doxorubicin treatment]. *Izvestiya Natsional'noy akademii nauk Belarusi. Seriya meditsinskikh nauk [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, Medical series]*. 2017;(1):83–89. (In Russian)].
3. Гендлин Г.Е., Емелина Е.И., Никитин И.Г., Васюк Ю.А. Современный взгляд на кардиотоксичность химиотерапии онкологических заболеваний, включающей антрациклиновые антибиотики. *Российский кардиологический журнал*. 2017;3:145–154. [Gendlin G.E., Emelina E.I., Nikitin I.G., Vasyuk Yu.A. Sovremennyy vzglyad na kardiotoksichnost' khimioterapii onkologicheskikh zabolevaniy, vlyuchayushchey antratsiklinovye antibiotiki [Modern view on cardiotoxicity of chemotherapeutics in oncology including anthracyclines]. *Rossiyskiy kardiologicheskij zhurnal [Russian Journal of Cardiology]*. 2017;(3):145–154. (In Russian)]. DOI: 10.15829/1560-4071-2017-3-145-154
4. Матяш М.Г., Кравчук Т.Л., Высоцкая В.В. Индуцированная антрациклинами кардиотоксичность: механизмы развития и клинические проявления. *Сибирский онкологический журнал*. 2008;6(30):66–75. [Matyas M.G., Kravchuk T.L., Vysotskaya V.V. Inducirovannaya antraciklinami kardiotoksichnost': mexanizmy razvitiya i klinicheskie proyavleniya [Anthracycline-induced cardiotoxicity: Mechanisms of development and clinical manifestations]. *Sibirskiy onkologicheskij zhurnal [Siberian journal of oncology]*. 2008;6(30):66–75. (In Russian)].
5. Мужикян А.А., Макарова М.Н., Гушчин Я.А. Особенности гистологической обработки органов и тканей лабораторных животных. *Международный вестник ветеринарии*. 2014;(2):103–109. [Muzhikyan A.A., Makarova M.N., Gushchin Ya.A. Osobennosti gistologicheskoy obrabotki organov i tkanej laboratornykh zhivotnykh [Features of histological processing of organs and tissues of laboratory animals]. *Mezhdunarodnyy vestnik veterinarii [International Bulletin of Veterinary Medicine]*. 2014;(2):103-109. (In Russian)].
6. Непомнящих Л.М. *Морфогенез важнейших общепатологических процессов в сердце*. Новосибирск: Наука, 1991:352. [Nepomnyashchikh L.M. *Morfogenez vazhneyshikh obshchepatologicheskikh protsessov v serdtse [Morphogenesis of the most important general pathological processes in the heart]*. Novosibirsk: Nauka Publ., 1991:352. (In Russian)].
7. Bovelli D., Plataniotis G., Roila F.; ESMO Guidelines Working Group. Cardiotoxicity of chemotherapeutic agents and radiotherapy-related heart disease: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Ann. Oncol.* 2010;21(Suppl. 5):277–282. DOI: 10.1093/annonc/mdq200
8. Couture L., Nash J.A., Turgeon J. The ATP-binding cassette transporters and their implication in drug disposition: A special look at the heart. *Pharmacol. Rev.* 2006;58(2):244–258. DOI: 10.1124/pr.58.2.7
9. de Baat E.C., Mulder R.L., Armenian S., Feijen E.A., Grotenhuis H., Hudson M.M. Mavinkurve-Groot-huis A.M.C., Kremer L.C.M., van Dalen E.C. Dextrazoxane for preventing or reducing cardiotoxicity in adults and children with cancer receiving anthracyclines. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2022;9(9):CD014638. DOI: 10.1002/14651858.CD014638.pub2
10. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. *European Treaty Series*. 1986:123.
11. Hasinoff B.B., Patel D., Wu X. The role of topoisomerase IIβ in the mechanisms of action of the doxorubicin cardioprotective agent dexrazoxane. *Cardiovasc. Toxicol.* 2020;20(3):312–320. DOI: 10.1007/s12012-019-09554-5
12. Kourek C., Touloupaki M., Rempakos A., Loritis K., Tsoungos E., Paraskevaidis I., Briasoulis A. Cardioprotective strategies from cardiotoxicity in cancer patients: A comprehensive review. *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* 2022;9(8):259. DOI: 10.3390/jcdd9080259
13. Pukhov S.A., Semakov A.V., Globa A.A., Anikina L.V., Afanasyeva S.V., Yandulova E.Y., Aleksandrova Y.R., Neganova M.E., Klochkov S.G. New conjugates of daunorubicin with sesquiterpene lactones and their biological activity. *Chemistry Select.* 2021;32(6):8446–8451. DOI: 10.1002/slct.202102244
14. Semakov A.V., Anikina L.V., Pukhov S.A., Afanasyeva S.V., Klochkov S.G. Conjugates of alan-tolactone with anthracycline antibiotics. *Chem. Nat. Compd.* 2016;52(4):695–696. DOI: 10.1007/s10600-016-1744-y
15. Swain S.M., Whaley F.S., Gerber M.C., Weisberg S., York M., Spicer D., Jones S.E., Wadler S., Desai A., Vogel C., Speyer J., Mittelman A., Reddy S., Pendergrass K., Velez-Garcia E., Ewer M.S., Bianchini J.R., Gams R.A. Cardioprotection with dexrazoxane for doxorubicin-containing therapy in advanced breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 1997;15(4):1318–1332. DOI: 10.1200/JCO.1997.15.4.1318

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Глоба Анастасия Алексеевна*, Институт физиологически активных веществ, ФГБУН «Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии» РАН;
e-mail: globa271194@mail.ru

Anastasiya A. Globa*, Institute of Physiologically Active Compounds, Federal Research Center of Problems of Chemical Physics and Medicinal Chemistry of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: globa271194@mail.ru

Семаков Алексей Владимирович, Институт физиологически активных веществ, ФГБУН «Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии» РАН;
e-mail: l_vok@list.ru

Aleksey V. Semakov, Institute of Physiologically Active Compounds, Federal Research Center of Problems of Chemical Physics and Medicinal Chemistry of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: l_vok@list.ru

Пухов Сергей Александрович, к.х.н., Институт физиологически активных веществ, ФГБУН «Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии» РАН;
e-mail: pukhov.sergey@gmail.com

Sergey A. Pukhov, Cand. Sci. (Chem.), Institute of Physiologically Active Compounds, Federal Research Center of Problems of Chemical Physics and Medicinal Chemistry of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: pukhov.sergey@gmail.com

Афанасьева Светлана Васильевна, к.х.н., Институт физиологически активных веществ, ФГБУН «Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии» РАН;
e-mail: svafa@ipac.ac.ru

Svetlana V. Afanasyeva, Cand. Sci. (Chem.), Institute of Physiologically Active Compounds, Federal Research Center of Problems of Chemical Physics and Medicinal Chemistry of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: svafa@ipac.ac.ru

Аникина Лада Владимировна, к.б.н., Институт физиологически активных веществ, ФГБУН «Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии» РАН;
e-mail: anikina1970@gmail.com

Lada V. Anikina, Cand. Sci. (Biol.), Institute of Physiologically Active Compounds, Federal Research Center of Problems of Chemical Physics and Medicinal Chemistry of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: anikina1970@gmail.com

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

ФИЗИКО-БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА N-АЦЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ RimL ГИПЕРТЕРМОФИЛЬНОЙ БАКТЕРИИ *THERMUS THERMOPHILUS*

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

Институт биологического приборостроения ФГБУН «Федеральный исследовательский центр
«Пушчинский научный центр биологических исследований РАН»
142290, Российская Федерация, Московская обл., Пушкино, пр-кт Науки, 3

N-концевые ацетилтрансферазы (NAT) бактерий участвуют в биосинтезе/деградации антибиотиков. Фермент RimL из *E. coli* обеспечивает ей резистентность к антибиотику микроцину С. На сегодняшний день хорошо изучены NAT патогенных бактерий, однако отсутствуют данные о NAT термофильных бактерий. Целью работы является исследование физико-химических свойств и специфичности новой NAT — RimL из *Thermus thermophilus*. Нами клонирована ОРС RimL (*TTHA1799*) и разработана методика очистки фермента. Методом собственной флуоресценции белка исследована стабильность RimL к рН, высоким температурам и денатурирующим агентам. Нами получен термофильный фермент, который может применяться в биотехнологии для ацетилирования белков и пептидов в нестандартных условиях.

Ключевые слова: антибиотикорезистентность, микроцин С, N-ацетилтрансферазы, GNAT-токсин-антитоксин, *Thermus thermophilus*

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 23-24-00478.

Для цитирования: Трунилина М.В., Вологжанникова А.А., Кудряшов Т.А., Локтюшов Е.В., Быков В.В., Соколов А.С., Лаптева Ю.С. Физико-биохимические свойства N-ацетилтрансферазы RimL гипертермофильной бактерии *Thermus thermophilus*. *Биомедицина*. 2024;20(3):47–51. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-3-47-51>

Поступила 15.04.2024

Принята после доработки 18.06.2024

Опубликована 10.09.2024

PHYSICAL AND BIOCHEMICAL PROPERTIES OF N-ACETYL TRANSFERASE RimL OF THE HYPERTHERMOPHILIC BACTERIA *THERMUS THERMOPHILUS*

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

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

Bacterial N-terminal acetyltransferases (NATs) are involved in the biosynthesis/degradation of antibiotics. The RimL enzyme from *E. coli* provides it with resistance to the antibiotic microcin C. To date, the NATs of pathogenic bacteria have been well studied, but there is no data on the NATs of thermophilic bacteria. The purpose of the work is to study the physicochemical properties and specificity of a new NAT — RimL from *Thermus thermophilus*. We cloned the RimL ORF (*TTHA1799*) and developed a method for purifying the enzyme. The stability of RimL to pH, high temperatures and denaturing agents was studied using the protein intrinsic fluorescence method. We have obtained a thermophilic enzyme that can be used in biotechnology for the acetylation of proteins and peptides under non-standard conditions.

Keywords: antibiotic resistance, microcin C, N-acetyltransferase, GNAT-toxin-antitoxin, microcin C, *Thermus thermophilus*

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

Funding: research was funded by a grant from the Russian Science Foundation, No. 23-24-00478.

For citation: Trunilina M.V., Vologzhannikova A.A., Kudryashov T.A., Loktyushov E.V., Bykov V.V., Sokolov A.S., Lapteva Yu.S. Physical and Biochemical Properties of N-Acetyl Transferase RimL of the Hyperthermophilic Bacteria *Thermus thermophilus*. *Journal Biomed.* 2024;20(3):47–51. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-3-47-51>

Submitted 15.04.2024

Revised 18.06.2024

Published 10.09.2024

Введение

N-ацетилтрансферазы (NAT) являются представителями многочисленного GNAT-суперсемейства ацетилтрансфераз (GNAT-AT) [1]. Ряд NAT участвуют как в биосинтезе, так и в инактивации антибиотиков [4, 6], формируют систему «токсин — антитоксин» типа II и рассматриваются в качестве мишеней для решения проблемы множественной антибиотикорезистентности бактерий [3, 7]. Резистентность к антибиотикам проявляет фермент RimL, который придаёт бактерии *E. coli* устойчивость к микроцину C и альбомуцину [6]. Ортологи RimL из разных бактерий ацетируют рибосомальный белок L12, который содержит N-концевой Ser или Ala [8]. NAT находят применение в практике направленного ацетилирования белков и пептидов [2, 5]. На сегодняшний день накоплены данные о ферментах патогенных бактерий, однако неизученными остаются ферменты термофильных бактерий, которые могут обладать преимуществами использования в биотехнологии перед своими мезофильными аналогами.

Цель работы — исследование физико-химических свойств и субстратной специфичности RimL из *T. thermophilus* (TTh-RimL).

Материалы и методы

Ген *TTHA1799*, кодирующий RimL (UniProt ID: Q5SHD1) бактерии *Thermus thermophilus*, клонировали в вектор pET-29 под контроль гибридного промотора T7/lac. Рекombинантный фермент RimL (TTh-RimL) нарабатывали в клетках *E. coli* BL21(DE3) и очищали при помощи аффинной хроматографии на Ni-NTA.

Изучение физико-химических свойств проводилось методом собственной флуоресценции белка. Спектры флуоресценции измеряли при 25°C на спектрофлуориметре Cary Eclipse при $\lambda_{\text{возб}}=280$ нм. Для определения стабильности TTh-RimL (1,4 мкМ) при различных pH его инкубировали в течение 5 мин при 25°C в буфере следующего состава: 6 мкМ MES 6.5, 6 мкМ HEPES, 6 мкМ H₃BO₄, 6 мкМ глицин, 6 мкМ ацетат натрия, доведённом до pH от 3 до 12 с шагом

0,5. Для изучения устойчивости TTh-RimL к денатурирующим агентам проводили его разворачивание в гуанидин гидрохлориде (GdHCl) в градиенте концентрации от 0 до 6 М с шагом 0,5 М при 25°C в реакционной смеси: 50 мМ MES 6.5, 150 мМ NaCl, 0,66 мкМ RimL. Термостабильность TTh-RimL измеряли в градиенте температур от 20 до 98°C с шагом 2°C в реакционной смеси: 50 мМ Na₂HPO₄ pH=8,1, 150 мМ NaCl, 1 мкМ TTh-RimL.

Методом ацетилирования *in vitro* пептидов с разными остатками на N-конце определяли субстратную специфичность TTh-RimL. Ацетилирование проводили в 50 мкл смеси: 50 мМ MES 6.5, 1 мкМ TTh-RimL, 100 мкМ АцКоА, 100 мкМ пептиды с N-концевыми Ala, Ser, Gly, инкубировали 1 ч при 60°C. Проверку уровня ацетилирования проводили при помощи реакции алдритиола с сульфгидрильной группой КоА, отслеживаемой по поглощению при длине волны 324 нм (λ_{324}). Измерение поглощения проводилось на BioTek Rider при 25°C, в течение 10 мин с интервалом 1 мин.

Результаты и их обсуждение

Ген *TTHA1799* (UniProt ID: Q5SHD1) бактерии *Thermus thermophilus* (ВКМ В-1605) клонирован в вектор pET-29. Разработана методика очистки фермента TTh-RimL, которая позволяет получать TTh-RimL до 50 мг/л культуры.

Методом собственной флуоресценции белка показано, что TTh-RimL не проявляет заметных pH-индуцируемых конформационных переходов белка в диапазоне pH от 4 до 12 (данные не представлены). Увеличение интенсивности флуоресценции (рис., А) свидетельствует о разворачивании молекул белка под действием GdHCl. Середина перехода TTh-RimL из нативного в денатурированное состояние, оценённая с использованием сигмоидальной функции, составляет 2,2 М GdHCl. График изменения интенсивности собственной флуоресценции на 304 нм при нагревании фермента (рис., Б) свидетельствует, что TTh-RimL является термостабильным (до 84°C) ферментом с серединой теплового перехода 88°C.

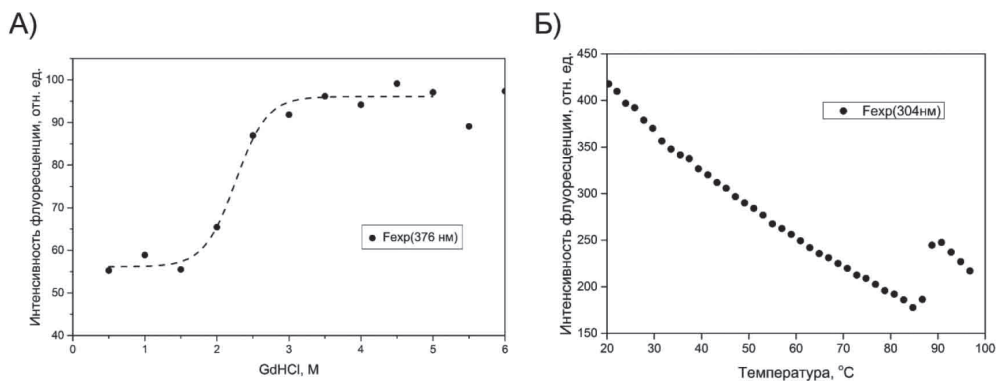


Рис. Параметры флуоресценции: А — изменение интенсивности собственной флуоресценции TTh-RimL на 376 нм от концентрации GdHCl; Б — изменение интенсивности собственной флуоресценции на 304 нм при повышении температуры.

Fig. Fluorescence parameters: А — change in the intrinsic fluorescence intensity of TTh-RimL at 376 nm from the GdHCl concentration; Б — change in the intensity of intrinsic fluorescence by 304 nm with increasing temperature.

В реакции ацетилирования пептидов показано, что фермент TTh-RimL проявляет специфическую функциональную активность, т. е. является NAT. Специфичность TTh-RimL в отношении пептидов снижается в ряду Ser → Gly → Ala.

Таким образом, нами получен термостабильный фермент, который может применяться в биотехнологии для ацетилирования белков и пептидов, предпочтительно с серином на N-конце, в широком диапазоне температур и в присутствии до 1,5 М GdHCl.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Burckhardt R.M., Escalante-Semerena J.C. Small-molecule acetylation by GCN5-related N-acetyltransferases in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2020;84(2):e00090-19. DOI: 10.1128/MMBR.00090-19
2. Chen J., Li H., Wang T., Sun S., Liu J., Chen J. Production of N(alpha)-acetyl Talphal-HSA through *in vitro* acetylation by RimJ. *Oncotarget.* 2017;8(56):95247–95255.
3. Hentchel K.L., Escalante-Semerena J.C. Acylation of biomolecules in prokaryotes: A widespread strategy for the control of biological function and metabolic stress. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2015;79(3):321–346. DOI: 10.1128/MMBR.00020-15
4. Huang E., Yousef A.E. Biosynthesis of paenibacillin, a lantibiotic with N-terminal acetylation, by *Paenibacillus polymyxa*. *Microbiol. Res.* 2015;181:15–21. DOI: 10.1016/j.micres.2015.08.001
5. Johnson M., Coulton A.T., Geeves M.A., Mulvihill D.P. Targeted amino-terminal acetylation of recombinant proteins in *E. coli*. *PLoS One.* 2010;5(12):e15801. DOI: 10.1371/journal.pone.0015801
6. Kazakov T., Kuznedelov K., Semenova E., Mukhamedyarov D., Datsenko K.A., Metlitskaya A., Vondenhoff G.H., Tikhonov A., Agarwal V., Nair S., Van Aer-schot A., Severinov K. The RimL transacetylase provides resistance to translation inhibitor microcin C. *J. Bacteriology.* 2014;196(19):3377–3385. DOI: 10.1128/JB.01584-14
7. Ren J., Sang Y., Lu J., Yao Y.F. Protein acetylation and its role in bacterial virulence. *Trends Microbiol.* 2017;25(9):768–779. DOI: 10.1016/j.tim.2017.04.001
8. Vetting M.W., de Carvalho L.P., Roderick S.L., Blanchard J.S. A novel dimeric structure of the RimL N-acetyltransferase from *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* 2005;280:22108–22114. DOI: 10.1074/jbc.M502401200

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Трунилина Мария Викторовна*, Институт биологического приборостроения ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»»;
e-mail: masha.trunilina@mail.ru

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

Кудряшов Тимофей Андреевич, Институт биологического приборостроения ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»»;
e-mail: kudryashovtimm@gmail.com

Maria V. Trunilina*, Institute of Biological Instrumentation of the Federal Research Center “Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences”;
e-mail: masha.trunilina@mail.ru

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

Timofey A. Kudryashov, Institute of Biological Instrumentation of the Federal Research Center “Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences”;
e-mail: kudryashovtimm@gmail.com

Локтюшов Евгений Владимирович, Институт биологического приборостроения ФГБУН «Федеральный исследовательский центр “Пушкинский научный центр биологических исследований РАН”»;

e-mail: zhenyaloktushov@gmail.com

Быков Вячеслав Владимирович, Институт биологического приборостроения ФГБУН «Федеральный исследовательский центр “Пушкинский научный центр биологических исследований РАН”»;

e-mail: naggilan88@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

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

Eugene V. Loktyushov, Institute of Biological Instrumentation of the Federal Research Center “Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences”;

e-mail: zhenyaloktushov@gmail.com

Vyacheslav V. Bykov, Institute of Biological Instrumentation of the Federal Research Center “Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences”;

e-mail: naggilan88@gmail.com

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

e-mail: 212sok@gmail.com

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

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

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

<https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-3-52-57>

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ДОКСОРУБИЦИНА НА КОГНИТИВНЫЕ НАРУШЕНИЯ И МИКРОСКОПИЧЕСКУЮ КАРТИНУ ОТДЕЛЬНЫХ СТРУКТУР ГОЛОВНОГО МОЗГА У КРЫС

И.В. Алексеев*, И.А. Мирошкина, А.В. Сорокина, И.Б. Цорин, Л.Г. Колик

ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр оригинальных и перспективных биомедицинских
и фармацевтических технологий»
125315, Российская Федерация, Москва, ул. Балтийская, 8

Создание валидированной модели «химического мозга» у лабораторных животных представляет собой актуальную задачу, решение которой позволит оптимизировать поиск новых средств для предупреждения и фармакологической коррекции отставленных последствий химиотерапии на центральную нервную систему. Цель работы — оценка влияния доксорубицина при системном курсовом введении на поведенческие реакции и микроскопическую картину коры больших полушарий и гиппокампа у крыс.

Доксорубицин вводили самцам крыс внутривенно в дозах 5 и 6 мг/кг, один раз в неделю, в течение 28 дней. Оценивали поведенческие реакции животных, проводили патоморфологические исследования коры больших полушарий головного мозга и гиппокампа.

Доксорубицин в дозах 5 и 6 мг/кг вызывает угнетение двигательной активности в тесте «Открытое поле», нарушение непространственной и пространственной памяти в тестах «Распознавание нового объекта» и «У-лабиринт» соответственно. Препарат в указанных дозах увеличивает выраженность полнокровия сосудов и периваскулярного отека в коре больших полушарий головного мозга и гиппокампе. Доксорубицин в дозах 5 и 6 мг/кг вызывает нарушение когнитивных функций у крыс в тестах на оценку непространственной и пространственной памяти, а также нарушения микроциркуляции в коре больших полушарий головного мозга и гиппокампе крыс.

Ключевые слова: доксорубицин, когнитивные нарушения, кора больших полушарий, гиппокамп, крысы

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Алексеев И.В., Мирошкина И.А., Сорокина А.В., Цорин И.Б., Колик Л.Г. Оценка влияния доксорубицина на когнитивные нарушения и микроскопическую картину отдельных структур головного мозга у крыс. *Биомедицина*. 2024;20(3):52–57. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-3-52-57>

Поступила 15.04.2024

Принята после доработки 26.07.2024

Опубликована 10.09.2024

DOXORUBICIN EFFECTS ON COGNITIVE IMPAIRMENT AND THE MICROSCOPIC VIEW OF BRAIN STRUCTURES IN RATS

Ivan V. Alekseev*, Irina A. Miroshkina, Aleksandra V. Sorokina, Iosif B. Tsorin, Larisa G. Kolik

Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies
125315, Russian Federation, Moscow, Baltiyskaya Str., 8

The creation of a validated model of the “chemical brain” in laboratory animals is an urgent task, the solution of which will optimize the search for new drugs for the prevention and pharmacological correction of delayed effects of chemotherapy on the central nervous system. The aim of the work has been to assess the effect of doxorubicin after systemic course administration on behavioral reactions and the microscopic view of the cerebral cortex and hippocampus in rats.

Doxorubicin was administered intraperitoneally to male rats at doses of 5 and 6 mg/kg, once a week, for 28 days. The behavioral reactions of the animals were assessed, and pathomorphological studies of the cerebral cortex and hippocampus were carried out.

Doxorubicin at doses of 5 and 6 mg/kg causes inhibition of motor activity in the “Open Field” test, impairment of non-spatial and spatial memory in the “New Object Recognition” and “Y-Maze” tests, respectively. Doxorubicin at these doses increases the severity of vascular congestion and perivascular edema in the cerebral cortex and hippocampus.

Doxorubicin at doses of 5 and 6 mg/kg causes impairment of cognitive functions in rats in tests assessing non-spatial and spatial memory, as well as microcirculation disorders in the cerebral cortex and hippocampus of rats.

Keywords: doxorubicin, cognitive impairment, cerebral cortex, hippocampus, rats

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

For citation: Alekseev I.V., Miroshkina I.A., Sorokina A.V., Tsorin I.B., Kolik L.G. Doxorubicin Effects on Cognitive Impairment and the Microscopic View of Brain Structures in Rats. *Journal Biomed.* 2024;20(3): 52–57. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-3-52-57>

Submitted 15.04.2024

Revised 26.07.2024

Published 10.09.2024

Введение

Разработка новых химиотерапевтических средств и схем лечения онкологических заболеваний привела к значительному снижению риска рецидивов и повышению выживаемости, что способствовало расширению осведомлённости о побочных эффектах химиотерапевтических средств, включая нежелательные эффекты на неопухолевые клетки, вторичные по отношению к предполагаемой цитотоксичности для раковых клеток. Одним из последствий современной терапии рака является когнитивная дисфункция, связанная с химиотерапией, обычно называемая «химическим мозгом» [2]. По оценкам, от 18 до 78% больных раком молочной железы сообщают о дискогнитивных расстройствах вскоре после начала химиотерапевтического лечения. Эти симптомы являются кратковременными у большинства пациентов, но, как сообщалось, сохраняются в течение нескольких месяцев

или лет у ~35% пациентов в безрецидивной ремиссии.

Доклинические исследования воздействия противоопухолевых препаратов на грызунов выявили несколько распространённых когнитивных нарушений, наблюдаемых у пациентов, включая нарушения памяти, опосредованные гиппокампом, что указывает на то, что экспериментальное моделирование когнитивных нарушений, вызванных химиотерапией, обладает высокой степенью достоверности для оценки последующих изменений поведенческих реакций [1]. Создание валидированной модели «химического мозга» у лабораторных животных представляет собой актуальную задачу, решение которой позволит оптимизировать поиск новых средств для предупреждения и фармакологической коррекции отставленных последствий химиотерапии на центральную нервную систему. Доксорубин (Dox), антрациклиновое

противоопухолевое средство, обычно используется в схемах комплексной химиотерапии для лечения солидных опухолей и лейкоза.

Цель работы — оценка влияния Dox при системном курсовом введении на поведенческие реакции и микроскопическую картину коры больших полушарий и гиппокампа у крыс.

Материалы и методы

Опыты проводили на конвенциональных белых крысах-самцах (возраст 16–17 недель, начальная масса 200–220 г) из нелинейных популяций, полученных из филиала «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России (Московская обл.). Животные прошли карантин в виварии ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий». Крысы содержались в полипропиленовых клетках Т/4 (габариты 580×375×200 мм) по 8 особей. Крысы получали комбикорм полнорационный для лабораторных животных ПК-120-191, производимый ООО «МЭСТ» (Россия), и фильтрованную водопроводную воду *ad libitum*. Животные содержались в контролируемых условиях (20–26°C, 30–70%-ная относительная влажность, 12-часовой цикл освещения и 8–10-кратная смена объёма воздуха в час). Все работы с лабораторными животными были выполнены в соответствии с ГОСТ 33044-2014 от 01.08.2015 г. «Принципы надлежащей лабораторной практики», Рекомендациями Коллегии Евразийской экономической комиссии № 33 от 14.11.2023 г., а также в соответствии с «Правилами работы с животными» ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий».

Дизайн исследования

Крыс разделили на три группы: 1-я группа — контроль (n=10); 2-я груп-

па — Dox (Доксорубицин-ЛЭНС®, ООО «ВЕРОФАРМ», Россия; лиофилизат для приготовления раствора, 2 мг/мл) в дозе 5 мг/кг (n=10); 3-я группа — Dox в дозе 6 мг/кг (n=11). Препарат вводили внутривентриально один раз в неделю в течение 28 дней. Крысы контрольной группы получали физ. р-р по аналогичной схеме.

Оценку поведенческих реакций проводили в тестах «Открытое поле» (29–30-е сут эксперимента), «Распознавание нового объекта» (31–32-е сут эксперимента), «У-лабиринт» (33–34-е сут эксперимента) с последующей регистрацией выживаемости (в %).

Все выжившие животные опытных и контрольных групп на 37-е сут эксперимента были подвергнуты эвтаназии и патологоанатомическому вскрытию с последующей оценкой микроскопической картины структур головного мозга. Фрагменты головного мозга (кора больших полушарий и гиппокампа) фиксировали в 96%-ном этаноле. После окончания стандартной гистологической проводки и заливки в парафиновые блоки готовили гистологические срезы толщиной 5 мкм. Полученные микропрепараты окрашивали галлоцианин-хромовыми квасцами с последующей окраской 1%-ным водным р-ром эозина. Микроскопировали в проходящем свете. Документировали изображения фотокамерой «Nikon DS-Fi1c» (Япония) с применением программы визуализации изображений NIS Elements BR для Nikon.

Результаты и их обсуждение

При оценке паттерна поведения крыс-самцов в тесте «Открытое поле» показано, что Dox вызывает угнетение двигательной активности в дозе 6 мг/кг ($p < 0,05$), вертикальной двигательной активности в дозе 5 мг/кг ($p < 0,05$) и отсутствие исследовательской активности по сравнению с контрольной группой.

В тесте «Распознавание нового объекта» животные контрольной группы уде-

ляли больше времени новому объекту. Животные, получавшие Dox (5 мг/кг), уделяли новому объекту такое же время, что и знакомому, что свидетельствует о нарушении дифференцировки между старым и новым объектами и ослаблении непространственной памяти. Вместе с тем получены парадоксальные данные у животных, получавших Dox (6 мг/кг), которые проявляли большую заинтересованность в новом объекте по сравнению со знакомым ($p < 0,05$).

Анализ данных, полученных в тесте «Y-образный лабиринт», позволяющем оценить изменения в пространственной памяти, показал, что через 24 ч после «знакомства» с Y-лабиринтом животные из опытных групп осуществляли меньше заходов в новый рукав С, а в дозе 6 мг/кг отмечалось снижение времени пребывания в новом рукаве ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой, что указывает на нарушение функции долговременной пространственной памяти под действием Dox.

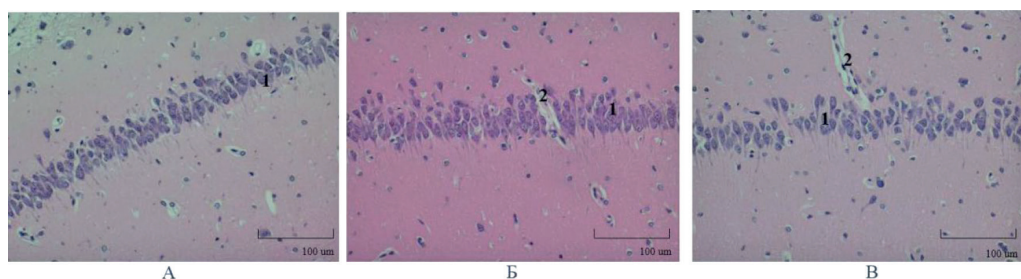


Рис. Микроскопическое исследование фрагментов зоны CA1 гиппокампа крыс (фиксация 10%-ным формалином, окраска галлоцианин-эозином, увеличение $\times 200$). А — контрольная группа, Б — Dox в дозе 5 мг/кг, В — Dox в дозе 6 мг/кг; 1 — округлые перикарионы пирамидных нейронов, 2 — периваскулярный отёк.

Fig. Fragments of the rat hippocampus CA1 zone (fixed with 10% formalin, stained with gallocyanin-eosin, magnification $\times 200$). А — control group, Б — Dox (5 mg/kg), В — Dox (6 mg/kg); 1 — rounded pyramidal neurons, 2 — perivascular edema.

Таблица. Влияние доксорубина на степень выраженности периваскулярного отёка и полнокровия с эритростазом в гиппокампе и в коре больших полушарий у крыс

Table. Effect of doxorubicin on the severity of perivascular edema and congestion with erythrosthosis in the hippocampus and cerebral cortex in rats

Показатель, баллы	Интактные, контроль n=5	Группа		Значимость по Краскелу — Уоллису
		Доксорубин, 5 мг/кг n=6	Доксорубин 6 мг/кг n=5	
Периваскулярный отёк в коре больших полушарий	2,00 2,00+2,00	2,00 2,00+3,00	3,00 3,00+3,00 $p < 0,05$	$p = 0,03$
Полнокровие сосудов с эритростазом в коре больших полушарий	3,00 2,00+3,00	4,00 3,00+4,00	4,00 3,00+4,00 $p < 0,05$	$p = 0,02$
Периваскулярный отёк в гиппокампе	3,00 2,00+3,00	3,00 3,00+4,00	3,00 3,00+3,00	$p = 0,26$
Полнокровие сосудов с эритростазом в гиппокампе	0,00 0,00+1,00	3,00 1,00+4,00 $p < 0,05$	2,00 2,00+4,00 $p < 0,05$	$p = 0,02$

Примечание: * — $p < 0,05$ по сравнению с интактными животными согласно непараметрическому аналогу дисперсионного анализа по Краскелу — Уоллису с дальнейшей обработкой методом множественных сравнений по Данну. Данные представляли в виде медиан, верхних и нижних квартилей.

Note: * — $p < 0,05$ compared with intact animals according to the nonparametric analogue of Kruskal — Wallis analysis of variance with further processing by Dunn's multiple comparison method. Data were presented as medians, upper and lower quartiles.

В ходе эксперимента наблюдалась дозозависимая динамика смертности: на 37-е сут в живых осталось 8 животных из 10 (5 мг/кг) и 6 животных из 11 (6 мг/кг).

Микроскопическое исследование показало, что в коре больших полушарий, а также в гиппокампе у контрольных крыс выявлялось умеренное полнокровие сосудов и единичные случаи периваскулярного отёка. У животных, получавших Dox (5 и 6 мг/кг), полнокровие сосудов и периваскулярный отёк в гиппокампе (рис.) и коре больших полушарий визуально были выражены сильнее.

Далее выполнено балльное шкалирование препаратов гиппокампа и коры больших полушарий. Показано, что выраженность периваскулярного отёка и полнокровия сосудов с эритростазом у животных, получавших Dox (5 и 6 мг/кг), была больше ($p < 0,05$), чем у крыс контрольной группы (табл.).

Впервые при микроскопическом исследовании препаратов головного мозга крыс, получавших Dox (5 и 6 мг/кг), выявлены расстройства микроциркуляции в коре больших полушарий головного мозга и гиппокампе. Полученные данные согласуются с представлениями о подверженности гиппокампа прямым или косвенным повреждениям, возникающим в результате системного применения Dox.

Выводы

Доксорубин в дозах 5 и 6 мг/кг при системном курсовом введении вызывает ослабление функций долговременно непространственной и пространственной памяти у крыс, которые сопровождаются нарушениями микроциркуляции в коре больших полушарий головного мозга и гиппокампе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. John J., Kinra M., Mudgal J., Viswanatha G.L., Nandakumar K. Animal models of chemotherapy-induced cognitive decline in pre-clinical drug development. *Psychopharmacology (Berl)*. 2021;238(11):3025–3053. DOI: 10.1007/s00213-021-05977-7
2. Sekeres M.J., Bradley-Garcia M., Martinez-Canabal A., Winocur G. Chemotherapy-induced cognitive impairment and hippocampal neurogenesis: A review of physiological mechanisms and interventions. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(23):12697. DOI: 10.3390/ijms222312697

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Иван Владимирович Алексеев*, ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий»;
e-mail: alekseev_iv@academpharm.ru

Ирина Александровна Мирошкина, к.б.н., ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий»;
e-mail: iris10.81@mail.ru

Александра Валериановна Сорокина, к.б.н., ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий»;
e-mail: sorokina_av@academpharm.ru

Ivan V. Alekseev*, Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies;
e-mail: alekseev_iv@academpharm.ru

Irina A. Miroshkina, Cand. Sci. (Biol.), Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies;
e-mail: iris10.81@mail.ru

Aleksandra V. Sorokina, Cand. Sci. (Biol.), Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies;
e-mail: sorokina_av@academpharm.ru

Иосиф Борисович Цорин, д.б.н., ФГБНУ
«Федеральный исследовательский центр оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий»;
e-mail: tsorinib@yandex.ru

Iosif B. Tsorin, Dr. Sci. (Biol.), Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies;
e-mail: tsorinib@yandex.ru

Лариса Геннадьевна Колик, д.б.н., проф. РАН, ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий»;
e-mail: lgkolik@mail.ru

Larisa G. Kolik, Dr. Sci. (Biol.), Prof. of the RAS, Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies;
e-mail: lgkolik@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author



СКРИНИНГ АГОНИСТОВ ХОЛИНОРЕЦЕПТОРОВ НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ *DAPHNIA MAGNA STRAUS*

А.А. Бондаренко^{1,2}

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

² ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»
197376, Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12

Проведена оценка острой токсичности и способности агонистов холинорецепторов вызывать у зоо-гидробионтов *Daphnia magna Straus* атипичную двигательную гиперактивность, эквивалентную выраженному судорожному состоянию у теплокровных животных. Определение данной тест-функции может быть полезно при скрининговой оценке фармакологической активности холинэргических веществ.

Ключевые слова: холинэргические вещества, агонисты холинорецепторов, первичный скрининг, *Daphnia magna Straus*

Конфликт интересов: автор заявил об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Бондаренко А.А. Скрининг агонистов холинорецепторов на экспериментальной модели *Daphnia magna Straus*. *Биомедицина*. 2024;20(3):58–60. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-3-58-60>

Поступила 04.04.2024

Принята после доработки 21.05.2024

Опубликована 10.09.2024

SCREENING OF CHOLINORECEPTOR AGONISTS IN EXPERIMENTAL MODEL ON *DAPHNIA MAGNA STRAUS*

Anastasiya A. Bondarenko^{1,2}

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

² Institute of Experimental Medicine
197376, Russian Federation, Saint Petersburg, Akademika Pavlova Str., 12

The acute toxicity and the ability of cholinoreceptor agonists to induce atypical motor hyperactivity in zoohydrobionts *Daphnia magna Straus*, equivalent to a significant seizure state in warm-blooded animals, were evaluated. Determination of this test function may be useful in screening assessment of pharmacological activity of cholinergic substances.

Keywords: cholinergic substances, cholinoreceptor agonists, primary screening, *Daphnia magna Straus*

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

For citation: Bondarenko A.A. Screening of Cholinoreceptor Agonists in Experimental Model on *Daphnia magna Straus*. *Journal Biomed*. 2024;20(3):58–60. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-3-58-60>

Submitted 04.04.2024

Revised 21.05.2024

Published 10.09.2024

Введение

Дафнии являются многоклеточными организмами, которые повсеместно используются в биотестировании по определению токсичности различных химических веществ. Они имеют целый ряд медиаторных и ферментных систем, в частности холинергическую медиаторную систему, аналогичную млекопитающим [2, 4, 5]. Поскольку эта медиаторная система у дафний достаточно хорошо изучена, представляется возможным проведение первичного скрининга холинергических веществ [2, 4]. Преимуществом проведения скрининга на дафниях является их удобство разведения в лабораторных условиях, небольшой размер особей, а также генетическая однородность синхронизированной культуры.

Добавление в водную среду агонистов холинорецепторов вызывает атипичную двигательную гиперактивность (АДГА) у дафний, что эквивалентно выраженному судорожному состоянию у теплокровных животных [1]. Данная тест-функция позволяет в дальнейшем проводить отбор эффективных противосудорожных препаратов по критерию предотвращения наступления АДГА у *Daphnia magna Straus*, тем самым сокращая использование млекопитающих в экспериментальных исследованиях.

Материалы и методы

Исследование выполнено на синхронизированной культуре зооидриобионтов *Daphnia magna Straus* в возрасте 7 сут, выращенных в лабораторных условиях в соответствии с требованиями международного стандарта по биотестированию воды [3]. Тестирование проводили в климатостате Р-2 (ООО «СФУ-Система», Россия) при температуре $20 \pm 1,0^\circ\text{C}$.

Объекты исследования: М-холиномиметик ареколин и антихолинэстеразные вещества физостигмин, галантамин и аминостигмин; содержание основного вещества составляло не менее 95%.

Среднелетальную концентрацию ($ЛК_{50}$) и минимальную концентрацию вызывающую АДГА у дафний ($ЭК_{99}$) определяли так, как описано в работе [1]. Концентрации определяли методом пробит-анализа. Каждый эксперимент повторяли трижды.

Результаты исследований

В таблице представлены результаты определения острой токсичности исследуемых веществ при экспозиции 24 ч, оценена способность препаратов вызывать у дафний АДГА.

Согласно полученным экспериментальным данным, галантамин обладает наименьшей токсичностью. Токсичность физостигмина и аминостигмина сопоставима

Таблица. Результаты определения $ЛК_{50}$ и $ЭК_{99}$ при экспозиции 24 ч

Table. The results of the determination of LC_{50} and EC_{99} in 24-hours exposure

Препарат	$ЛК_{50}$, мг/л ($M \pm m$)	$ЭК_{99}$, мг/л	$ЛК_{50}/ЭК_{99}$
Ареколин	$26,8 \pm 4,5$	16,0	1,7
Галантамин	$135,2 \pm 57,5$	0,13	1040
Аминостигмин	$96,3 \pm 34,9$	0,06	1605
Физостигмин	$106,8 \pm 32,3$	0,06	1780

Примечание: $ЛК_{50}$ — среднелетальная концентрация; $ЭК_{99}$ — минимальная концентрация, вызывающая АДГА; $ЛК_{50}/ЭК_{99}$ — отношение среднелетальной концентрации к минимальной концентрации, вызывающей АДГА. Концентрации определяли методом пробит-анализа.

Note: LC_{50} — median lethal concentration; EC_{99} — minimum concentration of inducing atypical motor hyperactivity; LC_{50}/EC_{99} — the ratio of the median lethal concentration to the minimum concentration inducing atypical motor hyperactivity. Concentrations were determined by the probit analysis method.

с галантамином, а наиболее токсичным воздействием на дафний обладает ареколин. При этом минимальная концентрация, вызывающая АДГА у дафний, для ареколина составила 16,0 мг/л, что всего в 1,7 раза ниже его среднелетальной концентрации. ЭК₉₉ физостигмина и аминистигмина в 1780 и 1605 раз меньше, чем их ЛК₅₀ соответственно, а галантамина — в 1040 раз меньше.

Выводы

Таким образом, по результатам скрининга агонистов холинорецепторов определена острая токсичность и способность вызывать АДГА у дафний, что позволяет в дальнейшем использовать их для первичного отбора противосудорожных веществ в экспериментальных моделях на *Daphnia magna* Straus.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Подосиновикова Н.П., Александрова М.Л., Бондаренко А.А., Горчакова Т.Л., Беспалов А.Я., Ватаева А.А., Мастерова К.В., Журкович И.К. Скрининг холинэргических фармакологических веществ на биологических тест-объектах — зоогидробионтах *Daphnia magna* Straus. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2022;85(5):3–9. [Podosinovicova N.P., Aleksandrova M.L., Bondarenko A.A., Gorchakova T.L., Bepalov A.Ja., Vataeva A.A., Masterova K.V., Zhurkovich I.K. Screening kholinergicheskikh farmakologicheskikh veshchestv na biologicheskikh test-ob"ektakh — zoogidrobiontakh *Daphnia magna* Straus [Screening of cholinergic drugs using *Daphnia magna* Straus hydrobionts as biological test objects]. *Experimental and Clinical Pharmacology*. 2022;85(5):3–9. (In Russian)]. DOI: 10.30906/0869-2092-2022-85-5-3-9
2. Подосиновикова Н.П., Космачев А.Б., Тонко-пий В.Д., Загребин А.О., Евдокимова Е.А., Малов А.М., Петров В.В., Долго-Сабуров В.Б. *Daphnia magna* Straus как объект при исследовании препаратов холинэргического типа действия. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2002;65(1):73–74. [Podosinovicova N.P., Aleksandrova M.L., Bondarenko A.A., Gorchakova T.L., Bepalov A.Ja., Vataeva A.A., Masterova K.V., Zhurkovich I.K. *Daphnia magna* Straus kak ob"ekt pri issledovanii preparatov kholinergicheskogo tipa deystviya [*Daphnia magna* Straus as an object for the study of preparations possessing cholinergic activity]. *Experimental and Clinical Pharmacology*. 2002;65(1):73–74. (In Russian)]. DOI: 10.30906/0869-2092-2002-65-1-73-74
3. ФР.1.39.2007.003222. *Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости дафний*. М.: АКВАРОС, 2007. [FR.1.39.2007.003222. *Metodika opredeleniya toksichnosti vody i vodnykh vytyazhek iz pochv, osadkov stochnykh vod, otkhodov po smertnosti i izmeneniyu plodovitosti dafniy* [Methodology for determining the toxicity of water and water extracts from soils, sewage sludge, waste by mortality and changes in the fertility of *Daphnia*]. Moscow: AKVAROS Publ., 2007. (In Russian)].
4. Ren Z., Zhang X., Wang X., Qi P., Zhang B., Zeng Y., Fu R., Miao M. AChE inhibition: One dominant factor for swimming behavior changes of *Daphnia magna* under DDVP exposure. *Chemosphere*. 2015;120:252–257. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2014.06.081
5. Tkaczyk A., Bownik A., Dudka J., Kowal K., Ślaska B. *Daphnia magna* model in the toxicity assessment of pharmaceuticals: A review. *Science of the Total Environment*. 2021;763:143038. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.143038

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРЕ | INFORMATION ABOUT THE AUTHOR

Бондаренко Анастасия Александровна, ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова ФМБА России», ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»;
e-mail: bondarenko-nastua@yandex.ru

Anastasiya A. Bondarenko, Golikov Research Clinical Center of Toxicology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia, Institute of Experimental Medicine;
e-mail: bondarenko-nastua@yandex.ru

<https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-3-61-65>



СОВРЕМЕННЫЕ ЖИВОТНЫЕ МОДЕЛИ ХИМИОИНДУЦИРОВАННОЙ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ ПОЛИНЕЙРОПАТИИ

В.А. Приходько^{1,2*}, Т.М. Матузок^{1,2}, 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 ФГБУН «Институт мозга человека им. Н.П. Бехтерева» РАН
197376, Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12, лит. А

Химиоиндуцированная периферическая нейропатия (ХИПН) является частым осложнением противоопухолевой химиотерапии, с трудом поддающимся коррекции у значительной части пациентов. Настоящий обзор посвящен современным моделям ХИПН на грызунах с использованием противоопухолевых средств различных групп.

Ключевые слова: химиоиндуцированная периферическая нейропатия, периферические полинейропатии, токсические полинейропатии, противоопухолевые средства

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Приходько В.А., Матузок Т.М., Оковитый С.В. Современные животные модели химиоиндуцированной периферической полинейропатии. *Биомедицина*. 2024;20(3):61–65. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-3-61-65>

Поступила 15.04.2024

Принята после доработки 03.06.2024

Опубликована 10.09.2024

CURRENT ANIMAL MODELS OF CHEMOTHERAPY-INDUCED PERIPHERAL POLYNEUROPATHY

Veronika A. Prikhodko^{1,2*}, Tatyana M. Matuzok^{1,2}, Sergey V. Okovitiy¹

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, Saint Petersburg, Akademika Pavlova Str., 12, lit. A

Chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN) is a common complication of antineoplastic chemotherapy. In a large number of patients, this complication is highly persistent to treatment. The present review is focused on current rodent CIPN models using antineoplastic agents of different groups.

Keywords: chemotherapy-induced peripheral neuropathy, peripheral polyneuropathies, toxic neuropathies, antineoplastic agents

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

For citation: Prikhodko V.A., Matuzok T.M., Okovitiy S.V. Current Animal Models of Chemotherapy-Induced Peripheral Polyneuropathy. *Journal Biomed*. 2024;20(3):61–65. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-3-61-65>

Submitted 15.04.2024
Revised 03.06.2024
Published 10.09.2024

Введение

Химиоиндуцированная полинейропатия (ХИПН) является одним из специфических осложнений противоопухолевой химиотерапии, диагностируемым у 68% пациентов в течение первого месяца, у 60% — через 3 мес., и у 30% — через 6 и более мес. после начала терапии [6]. Наиболее часто ХИПН выявляется у больных, получающих препараты платины (70–100%), таксаны (11–87%), винкаалкалоиды (20%), иммуномодуляторы группы талидомида (20–60%), ингибиторы протеасом (20–30%) и эпитилоны (60–65%). Резистентная к лечению ХИПН часто становится причиной необходимости снижения дозы химиотерапевтического препарата или его отмены, что отражается на прогнозе заболевания и выживаемости пациентов [1].

Таким образом, вопрос изучения патогенетических особенностей и возможностей коррекции ХИПН по-прежнему стоит остро, что требует разработки и валидации клинически релевантных моделей этого состояния. Настоящий обзор посвящён актуальным животным моделям ХИПН, основанным на использовании противоопухолевых средств различных классов.

Препараты платины (цисплатин, оксалиплатин, карбоплатин) реализуют свою противоопухолевую активность за счёт содержания образования при участии платины координационные связи между двумя основаниями ДНК (преимущественно гуаниновыми), что приводит к нарушению репликации и транскрипции, задержке клеточного цикла и апоптозу. Данные препараты демонстрируют большую универсальность при лечении злокачественных новообразований, включая саркомы, карциномы и лимфомы [2]. ХИПН на фоне их приёма развивается вследствие повре-

ждения ДНК в телах спинальных ганглиев и митохондриях, приводящего к оксидативному стрессу. Также известно, что возникающие обратимые острые симптомы ХИПН на фоне приёма оксалиплатина связаны с дисфункцией потенциалзависимых Na^+ -каналов аксонов [4].

ХИПН, вызываемая препаратами платины, является хронической, дозозависимой, развивается вследствие преимущественного поражения тел нейронов с последующей аксональной дегенерацией и носит сенсорный характер. Для оксалиплатина также характерна острая нейропатия, проявляющаяся холодовой дистальной дизестезией и парестезией. У животных наблюдали механическую аллодинию, сенсомоторные нарушения, термическую гипер- и гипоалгезию [3]. Более выраженное нейротоксическое действие среди препаратов платины оказывает цисплатин; карбоплатин вызывает ХИПН только в высоких дозах [4].

Таксаны (паклитаксел, доцетаксел) — производные дитерпенов, использующиеся для лечения рака молочной железы, яичников, лёгких, простаты и поджелудочной железы [1]. Таксаны усиливают процесс полимеризации тубулина и стабилизируют образующиеся микротрубочки, нарушая формирование веретена деления и ингибируя митоз [2]. Предполагается, что нейротоксичность таксанов обусловлена нарушением аксонального транспорта из-за чрезмерной полимеризации тубулина, а также патологическими изменениями в телах ганглиев дорсальных корешков спинного мозга [4]. ХИПН на фоне приёма таксанов носит преимущественно сенсорный характер, сопровождается поражением толстых миелинизированных волокон, развитием гипер- и гипоалгезии, механической аллодинии и нарушением сенсомоторной коор-

динации [3]. Наибольшей нейротоксичностью обладает паклитаксел [4].

Винкаалкалоиды (винкристин, винбластин, винорелбин, виндезин, винфлунин) — цитостатические средства, используемые в рамках режимов полихимиотерапии для лечения гемобластозов, эмбриональных опухолей, сарком и других видов злокачественных новообразований. Основным механизмом действия винкаалкалоидов является блокада полимеризации тубулина и сборки микротрубочек, что приводит к остановке митоза в метафазе и последующему апоптозу клетки. В клетках нервной системы винкаалкалоиды нарушают аксональный транспорт и функцию митохондрий, изменяют экспрессию мембранных потенциалзависимых ионных каналов, вызывают гипервозбудимость нейронов и нейровоспалительную реакцию [5].

ХИПН, вызываемая винкаалкалоидами, проявляется дозозависимо, развивается преимущественно по аксональному типу и носит сочетанный сенсомоторный характер с тенденцией к более раннему проявлению сенсорных симптомов [4]. В экспериментах на животных выявляются механическая аллодиния, аномалии походки, затрагивающие в первую очередь задние конечности, поражение толстых миелинизированных волокон и уменьшение амплитуд сенсорных ответов [2]. Наибольшей нейротоксичностью среди препаратов класса обладают винкристин и виндезин [4].

Талидомид — производное глутаримида, обладающее среди прочего иммуномодулирующей и антиангиогенной активностью, что обуславливает его применение в онкологии для лечения множественной миеломы. Талидомид нарушает кровообращение в эндоневральных капиллярах, а также угнетает сигнальные пути фактора роста нервов (NGF) [5]. ХИПН при введении талидомида является преимущественно аксональной, сенсорной с равновыраженным поражением толстых и тонких миелини-

зированных волокон. Противоопухолевые иммуномодуляторы нового поколения (леналидомид, помалидомид) имеют сравнительно меньшую нейротоксичность и реже становятся причиной ХИПН [3].

Бортезомиб — первый представитель класса ингибиторов протеасомы 26S, применяемый для терапии множественной миеломы и мантийноклеточной лимфомы. Бортезомиб вызывает накопление аберрантных белков в соме и аксоплазме нейронов, нарушает аксональный транспорт и митохондриальную функцию, вызывает стабилизацию микротрубочек, оксидативный стресс, активацию глиальных клеток и нейровоспаление [5]. ХИПН, вызываемая бортезомибом, чаще всего является аксональной (возможны и явления демиелинизации), симметричной, дистальной и со временем прогрессирует в проксимальном направлении. Её проявления носят преимущественно сенсорный характер и у животных включают механическую и холодовую аллодинию и механическую гипералгезию; при морфологическом исследовании выявляется поражение тонких миелинизированных волокон в большей степени, чем толстых. Карфилзомиб и иксазомиб вызывают ХИПН значительно реже [2].

Другие средства, которые продемонстрировали способность вызывать ХИПН в экспериментах на животных, включают ингибиторы топоизомераз (этопозид), антимиетаболиты (метотрексат), противоопухолевые антибиотики (доксорубицин, салиномицин), ингибиторы киназ (сорафениб), эпотилоны (иксабепилон), антагонисты ростовых факторов (сурамин) [3]. Сравнительная характеристика описанных в литературе моделей ХИПН представлена в таблице.

Выводы

Животные модели ХИПН представляют значительный интерес для современной нейрофизиологии и фармакологии.

Таблица. Сравнительная характеристика моделей химииндуцированной периферической нейропатии на грызунах [2, 3, 5]

Table. Comparative characteristics of models of chemically induced peripheral neuropathy in rodents [2, 3, 5]

Препарат	КД, мг/кг		Пути введения	Характер поражения			Нейропатия	
	Крысы	Мыши		АП	МП	НП	МНП	СНП
Препараты платины								
Цисплатин	0,05–112	10–42	В/в, в/б	+	+	+		+
Оксалиплатин	0,002–90	3–30	В/б, в/в, п/к	+		+		+
Карбоплатин	90–135	40	В/в, в/б	+		+		+
Таксаны								
Паклитаксел	2,68–64	4–180	В/б, п/к, в/в	+	+	+	+	+
Доцетаксел	10–50	15–50	В/в, в/б	+	+	+	+	+
Винкаалкалоиды								
Винкристин	0,42–1,4	0,01–34	В/в, в/б, п/к	+			+	+
Винорелбин		10–20	В/в	+				+
Иммуномодуляторы								
Талидомид	12 000	1–100	П/о, в/б	+				+
Леналидомид		1–100	В/б	+				+
Помалидомид		1–100	В/б	+				+
Ингибиторы протеасомы								
Бортезомиб	1–4,8	0,2–12	В/в, в/б, п/к	+	+	+		+
Другие								
Доксорубин	10		П/к	+		+	+	+
Иксабепилон		9–18	В/в	+		+		+
Метотрексат	0,5		В/б	+				+
Салиномицин		140	П/к	+	+		+	+
Сорафениб	140–2240		В/в, в/б, п/о	+				+
Сурамин	200–500	250	В/б	+	+	+	+	+
Этопозид		88	В/в	+	+	+	+	+

Примечание: КД — кумулятивная доза, АП — аксонопатия, МП — миелинопатия, НП — нейронопатия, МНП — моторная нейропатия, СНП — сенсорная нейропатия, в/в — внутривенно, в/б — внутривнутрибрюшинно, п/о — перорально, п/к — подкожно.

Note: КД — cumulative dose, АП — axonopathy, МП — myelinopathy, НП — neuronopathy, МНП — motor neuropathy, СНП — sensory neuropathy, в/в — intravenous, в/б — intraperitoneal, п/о — orally, п/к — subcutaneous.

Наиболее часто с этой целью применяются препараты платины, таксаны и винкаалкалоиды, однако имеются сообщения и о других средствах, способных вызывать ХИПН у грызунов. Описанные в литературе моде-

ли характеризуются высокой гетерогенностью режимов индукции ХИПН и различной степенью клинической релевантности, что создаёт предпосылки для их дальнейшего изучения и валидации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Banach M., Juranek J.K., Zygulska A.L. Chemotherapy-induced neuropathies — a growing problem for patients and health care providers. *Brain Behav.* 2016;7(1):e00558. DOI: 10.1002/brb3.558
2. Boehmerle W., Huehnen P., Peruzzaro S., Bal-kaya M., Endres M. Electrophysiological, behavioral and histological characterization of paclitaxel, cisplatin, vincristine and bortezomib-induced neuropathy in C57Bl/6 mice. *Sci. Rep.* 2014;4:6370. DOI: 10.1038/srep06370
3. Gadgil S., Ergün M., van den Heuvel S.A., van der Wal S.E., Scheffer G.J., Hooijmans C.R. A systematic summary and comparison of animal models for chemotherapy induced (peripheral) neuropathy (CIPN). *PLoS One.* 2019;14(8):e0221787. DOI: 10.1371/journal.pone.0221787
4. Grisold W., Cavaletti G., Windebank A.J. Peripheral neuropathies from chemotherapeutics and targeted agents: Diagnosis, treatment, and prevention. *Neuro Oncol.* 2012;14(Suppl 4):iv45–iv54. DOI: 10.1093/neuonc/nos203
5. Malacrida A., Meregalli C., Rodriguez-Menendez V., Nicolini G. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy and changes in cytoskeleton. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(9):2287. DOI: 10.3390/ijms20092287
6. Seretny M., Currie G.L., Sena E.S., Ramnarine S., Grant R., MacLeod M.R., Colvin L.A., Fallon M. Incidence, prevalence, and predictors of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: A systematic review and meta-analysis. *Pain.* 2014;155(12):2461–2470. DOI: 10.1016/j.pain.2014.09.020

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. Бехтеревой» 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. Бехтеревой» РАН;
e-mail: matuzok.tatyana@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

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



ВЛИЯНИЕ ФИТОЭКСТРАКТОВ ЖИВУЧКИ ТУРКЕСТАНСКОЙ И СПАРЖИ КИСТЕВИДНОЙ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ АЭРОБНО-АНАЭРОБНОГО ТРЕНИРОВОЧНОГО РЕЖИМА

Ю.С. Алексеева*, Ю.Д. Мельникова, А.Р. Коликова, В.Ц. Болотова, О.М. Спасенкова

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

В настоящем исследовании представлено влияние сухих экстрактов спаржи кистевидной (ЭСК) и живучки туркестанской (ЭЖТ) в дозах 100 мг/кг в сравнении с экстрактом левзеи сафлоровидной (ЭЛС) на эффективность аэробно-анаэробного тренировочного режима мышей-самок в тесте «Трёхнагрузочная плавательная проба» с грузом 10% от массы тела, а также на уровень малонового диальдегида и активность каталазы в гемолизате крови, сердечной и скелетной поперечнополосатой мышечной ткани и гомогенате печени. Полученные результаты указывают на сниженную выраженность перекисного окисления липидов под воздействием сухих экстрактов ЭСК и ЭЖТ, что свидетельствует об антиоксидантной активности экстрактов. В тесте «Трёхнагрузочная плавательная проба» было отмечено статистически значимое увеличение длительности плавания № 3 и индекса пробы в обеих группах по сравнению с контрольной, в связи с чем можно сделать вывод о положительном влиянии изучаемых объектов на процессы восстановления первой фазы.

Ключевые слова: *Asparagus racemosus*, *Ajuga turkestanica*, окислительный стресс, перекисное окисление липидов, малоновый диальдегид, каталаза

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Алексеева Ю.С., Мельникова Ю.Д., Коликова А.Р., Болотова В.Ц., Спасенкова О.М. Влияние фитоэкстрактов живучки туркестанской и спаржи кистевидной на эффективность аэробно-анаэробного тренировочного режима. *Биомедицина*. 2024;20(3):66–70. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-3-66-70>

Поступила 15.04.2024

Принята после доработки 03.06.2024

Опубликована 10.09.2024

INFLUENCE OF AJUGA TURKESTANICA AND ASPARAGUS RACEMOSUS PHYTOEXTRACTS ON THE EFFECTIVENESS OF AEROBIC–ANAEROBIC TRAINING REGIME

Yuliya S. Alekseeva*, Yuliya D. Melnikova, Anastasia R. Kolikova,
Vera Ts. Bolotova, Olga M. Spasenkova

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 work, we study the effect of *Asparagus racemosus* (EAR) and *Ajuga turkestanica* (EAT) dry extracts at a dose of 100 mg/kg in comparison with a *Rhaponticum carthamoides* extract (ERC) on the effectiveness of an aerobic–anaerobic training regimen in female mice in a triple-weight loaded exhaustive swim test with a 10% load of body weight, as well as on the level of malondialdehyde and catalase activity in blood

hemolysate, cardiac and skeletal striated muscle tissue, and liver homogenate. The results obtained indicate a reduced severity of lipid peroxidation under the influence of dry EAR and EAT extracts, thus pointing to the antioxidant activity of the extracts. In the conducted triple-weight loaded exhaustive swim test, a statistically significant increase in the duration of swimming No. 3 and the test index was noted in both groups compared to the control. Therefore, it can be concluded that the studied extracts have a positive effect on the first-phase recovery processes.

Keywords: *Asparagus racemosus*, *Ajuga turkestanica*, oxidative stress, lipid peroxidation, malondialdehyde, catalase

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

For citation: Alekseeva Yu.S., Melnikova Yu.D., Kolikova A.R., Bolotova V.Ts., Spasenkova O.M. Influence of *Ajuga turkestanica* and *Asparagus racemosus* Phytoextracts on the Effectiveness of Aerobic–Anaerobic Training Regime. *Journal Biomed.* 2024;20(3):66–70. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-3-66-70>

Submitted 15.04.2024

Revised 03.06.2024

Published 10.09.2024

Введение

В условиях высокой интенсивности или длительности тренировочный процесс может являться источником стресса для организма. В связи с этим для сглаживания стресс-реакции в спортивной фармакологии используются адаптогенные средства химического и растительного происхождения. Спаржа кистевидная (*Asparagus racemosus*, сем. *Asparagaceae*) и живучка туркестанская (*Ajuga turkestanica*, сем. *Lamiaceae*) обладают адаптогенной активностью за счёт входящих в их состав веществ (стероидных сапонинов и фитозкдистероидов соответственно) [4, 5].

Целью нашего исследования являлась оценка влияния сухих экстрактов спаржи кистевидной и живучки туркестанской на эффективность аэробно-анаэробного тренировочного режима в эксперименте.

Материалы и методы

В качестве объектов исследования были выбраны сухие экстракты живучки туркестанской (ЭЖТ, 100 мг/кг) и спаржи кистевидной (ЭСК, 100 мг/кг) (ООО «Грин Трейд», Россия), дозы которых были подобраны в предварительной серии экспери-

ментов. Сухой экстракт левзеи сафлоровидной (ООО «Казанский Завод экстрактов», Россия) (ЭЛС, 100 мг/кг), являющийся растительным адаптогенным средством с доказанной эффективностью, выступал в качестве препарата сравнения.

Исследования проводили на 50 белых аутбредных мышах-самках с массой 17,2–25,5 г в соответствии с «Правилами надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств» (решение Совета ЕЭК № 81 от 03.11.2016 г.), согласно утверждённому письменному протоколу. Экспериментальные животные были получены из Филиала НИЦ «Курчатовский Институт» — ПИЯФ — Питомник ЛЖ «Рапполово» (Ленинградская обл.), прошли необходимый карантин и содержались в стандартных условиях сертифицированного вивария на обычном пищевом рационе, со свободным доступом к воде. Перед началом эксперимента мыши были разделены методом стратификационной рандомизации на 5 групп (n=10) на основании длительности выполнения нагрузки в тесте «Вынужденное плавание» с грузом 10% от массы тела. Группы ЭЛС, ЭЖТ и ЭСК получали соответствующие препараты

в дозе 100 мг/кг. Интактной и контрольной группам вводили физ. р-р в эквивалентном количестве. Все группы, за исключением интактной, подвергались аэробно-анаэробному тренировочному режиму. Животные получали препараты за 30 мин до тренировки. Аэробно-анаэробные тренировки с грузом 7,5% от массы тела проводили в специальной плавательной установке три раза в неделю на протяжении 2 недель при температуре воды 22–24°C. Тренировку заканчивали в случае пребывания животного под водой более 3 сек. По окончании тренировочного режима проводился тест «Трёхнагрузочная плавательная проба»

с грузом 10% от массы тела: оценивали длительности трёх последовательных нагрузок (№ 1–3), индекс пробы, равный отношению нагрузки № 3 к нагрузке № 1 [1]. На следующий день проводили забор крови и органов для последующего определения содержания малонового диальдегида (МДА) по методике И.Д. Стальной и соавт. [3] и активность каталазы по методике М.А. Королюка и соавт. [2] в печени, миокарде, скелетных мышцах задней конечности, а также в гемолизате крови.

Статистическую обработку производили в пакете статистического анализа данных GraphPad Prism 10.1.0. В случае нормаль-

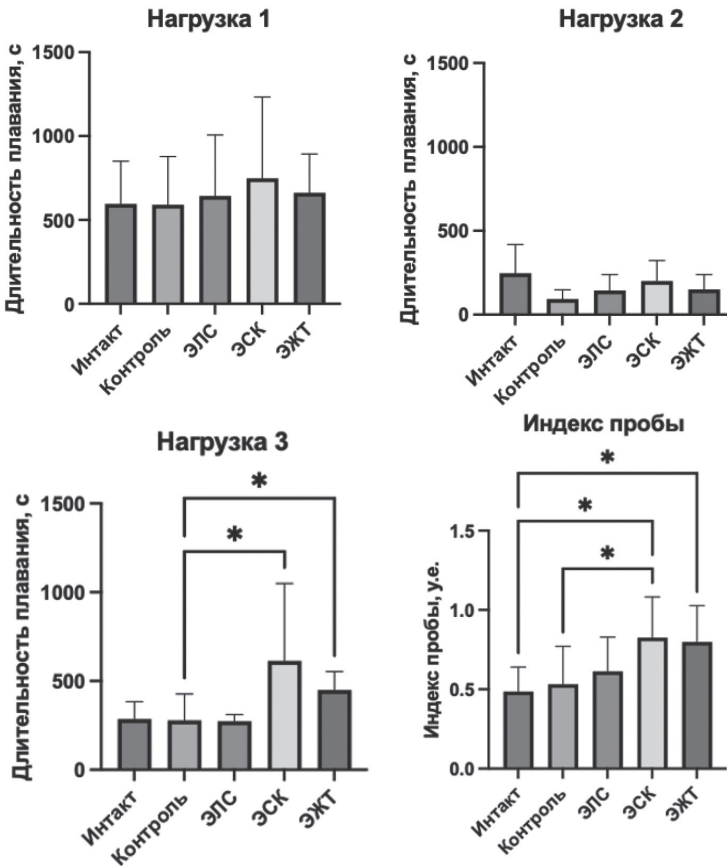


Рис. Результаты теста «Трёхнагрузочная плавательная проба» (* — $p < 0,05$).
Fig. Results of the triple-weight loaded exhaustive swim test (* $p < 0.05$).

ного распределения данных использовали метод однофакторного (тест ANOVA) дисперсионного анализа. Если распределение было отличным от нормального, определение статистической значимости проводили с помощью критерия Краскела—Уоллиса. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

В результате проведения трёхнагрузочной плавательной пробы было отмечено увеличение времени плавания № 3 в группе ЭСК (+120,5%) и ЭЖТ (+61,4%) по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$). Увеличение показателя «индекс пробы» в этих же группах по сравнению с контролем ($p < 0,05$) свидетельствует о более эффективном протекании процессов восстановления первой фазы, а именно утилизации лактата и восстановления углеводного пула в реакциях глюконеогенеза [1] (рис.).

При исследовании уровня МДА установлено, что в контрольной группе животных, подвергавшихся тренировкам, по сравнению с интактной группой имелась тен-

денция к повышению содержания МДА в скелетных мышцах, миокарде и печени. Одновременно возрастала активность каталазы, определяемой в миокарде и гемолизате крови.

Применение исследуемых растительных экстрактов привело к определённой снижению концентрации МДА в миокарде, а также в гомогенате печени и гемолизате крови. Активность каталазы в миокарде уменьшалась в группе ЭЖТ в 1,62 раза, а в группе ЭСК — в 1,71 раза. В гемолизате крови аналогичный показатель снижался в группе ЭЖТ в 1,44 раза; в группе ЭСК — в 1,48 раза.

Выводы

ЭЖТ и ЭСК снижают выраженность процессов перекисного окисления липидов в гемолизате крови, печени, скелетной и сердечной поперечнополосатой мышечной ткани в аэробно-анаэробном тренировочном режиме. Изучаемые фитоадаптогены положительно влияли на динамические показатели выносливости (длительность нагрузки № 3, индекс пробы).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Биомедицинское (доклиническое) изучение лекарственных средств, влияющих на физическую работоспособность: метод. реком. Под ред. Н.Н. Каркищенко. М.: ФМБА России, 2017:134. [Biomeditsinskoe (doklinicheskoe) izuchenie lekarstvennykh sredstv, vliyayushchikh na fizicheskuyu rabotosposobnost': metod. rekom. [Biomedical (preclinical) study of drugs that affect physical performance: Guidelines]. Ed. by N.N. Karkischenko. Moscow: FMBA of Russia Publ., 2017:134. (In Russian)].
2. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Т. Метод определения активности каталазы. *Лабораторное дело*. 1998;1:16–19. [Korolyuk M.A., Ivanova L.I., Majorova I.T. Metod opredeleniya aktivnosti katalazy [Method for determining catalase activity]. *Laboratornoe delo* [Laboratory work]. 1998;1:16–19. (In Russian)].
3. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты. *Современные методы в биохимии*. М.: Медицина, 1977:66–68. [Stal'naya I.D., Garishvili T.G. Metod opredeleniya malonovogo dial'degida s pomoshch'yu tiobarbiturovoj kisloty [Method for determination of malondialdehyde using thiobarbituric acid]. *Sovremennye metody v biohimii* [Modern methods in biochemistry]. Moscow: Medicina Publ., 1977:66–68. (In Russian)].
4. Mamarasulov B., Davranov K., Jabborova D. Phytochemical, pharmacological and biological properties of *Ajuga turkestanica* (Rgl.) Brig (Lamiaceae). *Ann. Phytomed.* 2020;9(1):44–57. DOI: 10.21276/ap.2020.9.1.6
5. Singh N., Garg M., Prajapati P., Singh P.K., Chopra R., Kumari A., Mittal A. Adaptogenic property of *Asparagus racemosus*: Future trends and prospects. *Heliyon*. 2023;9(4):e14932. DOI: 10.1016/j.heliyon.2023.e14932

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Алексеева Юлия Сергеевна*, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России;
e-mail: julija.alekseeva@pharminnotech.com

Yuliya S. Alekseeva*, Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: julija.alekseeva@pharminnotech.com

Мельникова Юлия Дмитриевна, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России;
e-mail: yuliya.melnikova@spcpu.ru

Yuliya D. Melnikova, Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: yuliya.melnikova@spcpu.ru

Коликова Анастасия Романовна, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России;
e-mail: anastasiya.kolikova@spcpu.ru

Anastasiya R. Kolikova, Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: anastasiya.kolikova@spcpu.ru

Болотова Вера Цезаревна, к.фарм.н., доц., ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России;
e-mail: vera.bolotova@pharminnotech.com

Vera Ts. Bolotova, Cand. Sci. (Pharm.), Assoc. Prof., Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: vera.bolotova@pharminnotech.com

Спасенкова Ольга Михайловна, к.м.н., доц., ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России;
e-mail: olga.spasenkova@pharminnotech.com

Olga M. Spasenkova, Cand. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: olga.spasenkova@pharminnotech.com

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

<https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-3-71-74>



ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ СИСТЕМЫ ОБЕСПЕЧЕНИЯ КАЧЕСТВА ПРИ ИЗУЧЕНИИ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ ЭТМАБЕНА

А.Ю. Гришина*, Д.Ю. Ивкин, С.М. Напалкова, О.В. Буюклинская

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

Система обеспечения качества играет ключевую роль в доклинических исследованиях, где каждая деталь должна быть строго контролируема и проверяема. Одним из компонентов системы обеспечения качества является стандартная операционная процедура, которая определяет точные шаги и методы для выполнения определённой задачи или процесса в лаборатории. В данной статье рассмотрены основные компоненты системы обеспечения качества на примере изучения фармакологической безопасности производного малоновой кислоты.

Ключевые слова: надлежащая лабораторная практика, крысы, стандартная операционная процедура

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Гришина А.Ю., Ивкин Д.Ю., Напалкова С.М., Буюклинская О.В. Функционирование системы обеспечения качества при изучении фармакологической безопасности этмабена. *Биомедицина*. 2024;20(3):71–74. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-3-71-74>

Поступила 15.04.2024

Принята после доработки 03.06.2024

Опубликована 10.09.2024

QUALITY ASSURANCE SYSTEM WHEN STUDYING THE PHARMACOLOGICAL SAFETY OF ETMABEN

Anna Yu. Grishina*, Dmitry Yu. Ivkin, Svetlana M. Napalkova, Olga V. Buyuklinskaya

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

Quality assurance plays a key role in preclinical research, where every detail must be strictly controlled and verified. Standard operating procedures are essential part of any quality assurance system, defining precisely the steps and methods of implementing certain tasks or processes in a laboratory. In this article, the main components of a quality assurance system are discussed using the example of studying the pharmacological safety of a malonic acid derivative.

Keywords: good laboratory practice, rats, standard operating procedure

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

For citation: Grishina A.Yu., Ivkin D.Yu., Napalkova S.M., Buyuklinskaya O.V. Quality Assurance System when Studying the Pharmacological Safety of Etmaben. *Journal Biomed*. 2024;20(3):71–74. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-3-71-74>

Submitted 15.04.2024

Revised 03.06.2024

Published 10.09.2024

Введение

В рамках изучения фармакологической безопасности (ФБ) проводятся исследования, направленные на выявление возможных нежелательных фармакодинамических эффектов лекарственных средств, которые имеют отношение к физиологическим функциям, в дозах, соответствующих терапевтическому диапазону и выше [1]. Кроме того, оценка ФБ позволяет выявить компоненты вторичной фармакодинамики, если она проявляется при однократном дозировании.

Цель работы — показать функционирование системы обеспечения качества (СОК) на примере исследования ФБ производного малоновой кислоты (ПМК) — (4-((3-оксо-3-этоксипропаноил)амино)бензойной кислоты).

Материалы и методы

Для достижения цели проведён анализ ряда нормативных документов в области обеспечения качества и документов собственной СОК.

Результаты и их обсуждение

Основополагающим документом для обеспечения качества исследований является ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики». Испытательные лаборатории подтверждают достоверность и качество полученных данных отчётными документами, ценными для последующих этапов разработки и регистрации лекарственных средств.

Исследования проводятся на самцах и/или самках крыс или мышей. Перед началом исследования животных подвергают адаптации и рандомизируют в экспериментальные группы. В ходе предварительных исследований определяется диапазон доз, в которых испытуемое вещество вводится в эксперименте, для установления выражен-

ного токсического эффекта и для оценки дозозависимости. Как правило, используется плацебо и пять уровней доз при однократном введении. В ходе данных исследований оценивается влияние на сердечно-сосудистую, дыхательную и центральную нервную системы [2]. Не требует немедленного изучения, но может быть проведена оценка воздействия на системы, функции которых могут временно нарушаться без причинения необратимого вреда (например, мочевыделительная, пищеварительная). В таком случае выбор дополнительных систем будет зависеть от планируемого клинического исследования или популяции пациентов. Например, при болезни Крона необходимо изучение влияния на пищеварительную систему, а при первичной ренальной артериальной гипертензии — на функцию почек. ГОСТ Р 56700-2015 [3] содержит основные требования к проведению исследований ФБ, однако для обеспечения надлежащего качества исследований необходимо в полном объёме обеспечить персонал информативными стандартными операционными процедурами (СОП). СОП позволяют стандартизировать процессы и процедуры, что способствует повышению качества доклинических исследований и снижению рисков ошибок, обеспечивают надёжность и последовательность в проведении исследований. Алгоритм действий при оценке ФБ с точки зрения обеспечения качества с помощью СОП проиллюстрирован в таблице.

Заключение

Применение СОП даже в краткосрочных исследованиях способствует обеспечению высокого уровня контроля качества исследований, единого подхода к выполнению задач, минимизации ошибок и позволяет соответствовать имеющимся регуляторным стандартам.

Таблица. Применение внутренней нормативной документации для достижения результата при изучении фармакологической безопасности производного малоновой кислоты

Table. Application of internal regulatory documentation to achieve results in studying the pharmacological safety of a malonic acid derivative

<p>1. Планирование исследования</p> <ul style="list-style-type: none"> - СОП «Документирование первичных данных»; - СОП «Управление рабочими инструкциями в рамках GLP»; - СОП «Регистрация, учёт и движение образцов для исследований»; - СОП «Отклонения СОП, протокола от принципов GLP»; - СОП «Корректирующие и предупреждающие действия»; - СОП «План исследования»; - СОП «Отчёт по исследованию»; - СОП «Проведение инспекций исследования в рамках GLP» 	<p>2. Биоэтическая комиссия</p> <ul style="list-style-type: none"> - СОП «Содержание и использование лабораторных животных»; - СОП «Комиссия по биоэтике»; - СОП «Рассмотрение протоколов-заявок на лабораторных животных»; - СОП «Проверка и оценка правил по уходу и работе с лабораторными животными» 	<p>3. Приёмка животных</p> <ul style="list-style-type: none"> - СОП «Заказ и движение лабораторных животных»; - СОП «Содержание и использование лабораторных животных»; - СОП «Размещение лабораторных животных»
<p>4. Адаптация</p> <ul style="list-style-type: none"> - СОП «Карантирование и адаптация»; - СОП «Рутинные манипуляции по уходу за животными» 	<p>5. Ветеринарный осмотр</p> <ul style="list-style-type: none"> - СОП «Ветеринарный и клинический осмотр»; - СОП «Эвтаназия»; - СОП «Признаки нарушения здоровья»; - СОП «Категория боли и анальгезия» 	<p>6. Санитарная обработка</p> <ul style="list-style-type: none"> - СОП «Ежедневная санитарная обработка помещений»; - СОП «Санитарная обработка клеток и аксессуаров для содержания»
<p>7. Контроль температуры</p> <ul style="list-style-type: none"> - СОП «Порядок регистрации температуры и относительной влажности» 	<p>8. Идентификация и формирование групп</p> <ul style="list-style-type: none"> - СОП «Идентификация животных»; - СОП «Формирование групп»; - СОП «Фиксация животных»; - СОП «Идентификация клеток» 	<p>9. Содержание животных</p> <ul style="list-style-type: none"> - СОП «Принципы работы в комнате содержания»; - СОП «Размещение животных»; - СОП «Рутинные манипуляции по уходу за животными»; - СОП «Контроль воды»
<p>10. Введение ЛП</p> <ul style="list-style-type: none"> - СОП «Принципы работы в комнате содержания»; - СОП «Внутрижелудочное введение вещества»; - СОП «Санитарная обработка желудочных зондов» 	<p>11. Оценка ЦНС</p> <ul style="list-style-type: none"> - СОП «Фиксация животных» 	<p>12. Оценка ССС и ДС</p> <ul style="list-style-type: none"> - СОП «Фиксация животных»; - СОП «Внутрибрюшинная инъекция»; СОП «Категория боли и анальгезия»
<p>13. Анализ крови</p> <ul style="list-style-type: none"> - СОП «Взятие крови из десны»; - СОП «Порядок сбора материалов и предметов, загрязнённых кровью»; - СОП «Фиксация животных»; - СОП «Санитарная обработка посуды и инструментов»; - СОП «Обращение с колющими и режущими предметами»; - СОП «Правила охраны труда и техника безопасности»; - СОП «Учёт, квалификация и эксплуатация лабораторного оборудования»; СОП «Перемещение сотрудников по ЦЭФ и соблюдение правил личной гигиены» 		

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

- ГОСТ 33044-2014. *Принципы надлежащей лабораторной практики (с Поправкой)*. М.: Стандартинформ, 2019:16. [GOST 33044-2014. *Printsipy nadlezhashchey laboratornoy praktiki (s Popravkoj)* [Principles of Good Laboratory Practice (with Amendment)]; Moscow: Standardinform Publ., 2019:16. (In Russian)].
- ГОСТ Р 56700-2015. *Лекарственные средства для медицинского применения. Доклинические фармакологические исследования безопасности*.

М.: Стандартинформ, 2016:8. [GOST R 56700-2015. *Lekarstvennye sredstva dlya meditsinskogo primeneniya. Doklinicheskie farmakologicheskie issledovaniya bezopasnosti* [Medicines for medical use.

Preclinical pharmacological safety studies]. Moscow: Standardinform Publ., 2016:8. (In Russian)].
3. URL: https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_366430

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Гришина Анна Юрьевна*, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России;
e-mail: anna.grishina@pharminnotech.com

Anna Yu. Grishina*, Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: anna.grishina@pharminnotech.com

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

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

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ДВОЙНОЙ КОМБИНИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

Д.Ю. Ивкин^{1,*}, М.В. Краснова¹, А.А. Карпов¹, 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

Представлены результаты экспериментальных исследований эффективности двойных комбинаций традиционных средств базисной терапии хронической сердечной недостаточности с эмпаглифлозином при моделировании патологии у лабораторных аутбредных крыс. В рамках исследования проводилась оценка выживаемости, физической выносливости, эхокардиографических показателей. Наиболее эффективной оказалась комбинация эмпаглифлозина с фозиноприлом: шестимесячная выживаемость составила 90%, наблюдалась наибольшая толерантность к физической нагрузке (50% прирост по отношению к животным группы патологии без лечения), фракции укорочения и выброса возрастали на 25%.

Ключевые слова: тредмил, фозиноприл, бисопролол, спиронолактон

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Ивкин Д.Ю., Краснова М.В., Карпов А.А., Оковитый С.В., Куликов А.Н. Оценка эффективности двойной комбинированной терапии экспериментальной хронической сердечной недостаточности. *Биомедицина*. 2024;20(3):75–79. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-3-75-79>

Поступила 15.04.2024

Принята после доработки 03.06.2024

Опубликована 10.09.2024

EFFICACY ASSESSMENT OF DUAL COMBINED THERAPY IN EXPERIMENTAL CHRONIC HEART FAILURE

Dmitry Yu. Ivkin^{1,*}, Marina V. Krasnova¹, Andrew A. Karpov¹,
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 experimental studies into the efficacy of dual combinations of conventional drugs for the basic treatment of chronic heart failure with empagliflozin when modeling the pathology in laboratory outbred rats. As part of the study, survival, physical tolerance, and echocardiographic parameters were assessed. The most effective combination was found to be the therapy by empagliflozin

with fosinopril. In this case, the six-month survival rate achieved 90%; a greater tolerance to physical activity was observed (50% increase in relation to animals in the pathology group without treatment); shortening and ejection fractions increased by 25%.

Keywords: treadmill, fosinopril, bisoprolol, spironolactone

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

For citation: Ivkin D. Yu., Krasnova M. V., Karpov A. A., Okovityi S. V., Kulikov A. N. Efficacy Assessment of Dual Combined Therapy in Experimental Chronic Heart Failure. *Journal Biomed.* 2024;20(3):75–79. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-3-75-79>

Submitted 15.04.2024

Revised 03.06.2024

Published 10.09.2024

Введение

В нескольких ранее проведённых нами исследованиях продемонстрирована эффективность эмпаглифлозина в сравнении с препаратами традиционной базисной терапии при экспериментальной постинфарктной хронической сердечной недостаточности (ХСН) [2]. Однако дизайн этих исследований предполагал оценку схем монотерапии, тогда как классическое лечение подразумевает назначение комбинации препаратов.

Целью работы явилось изучение влияния эмпаглифлозина и средств традиционной базисной терапии ХСН в различных двойных комбинациях на эхокардиографические показатели, толерантность к физической нагрузке (бег) и выживаемость.

Материалы и методы

Крысы-самцы были получены из ФГУП ПЛЖ «Рапполово» (Ленинградская обл.), содержались в условиях 12/12-часового свето-темнового режима и получали стандартный корм и питьевую воду *ad libitum*. 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 СПХФУ. ХСН моделировали путём перманентной перевязки левой коронар-

ной артерии [1]. Результаты первого этапа с проведением монотерапии в течение 3 мес. описаны ранее (группа 1 — патология без лечения; группа 2 — эмпаглифлозин, 1 мг/кг; группа 3 — фозиноприл, 10 мг/кг; группа 4 — бисопролол, 10 мг/кг; группа 5 — спиронолактон, 20 мг/кг) [2]. Следующие 3 мес. распределение животных было следующим: группа 1 — патология без лечения; группа 2 — эмпаглифлозин + фозиноприл; группа 3 — фозиноприл + бисопролол; группа 4 — бисопролол + эмпаглифлозин; группа 5 — спиронолактон + эмпаглифлозин.

Результаты исследований

Выживаемость через 7 мес. после перевязки левой коронарной артерии составила 60, 90, 60, 80 и 70% в группах 1–5 соответственно.

При оценке толерантности к физической нагрузке у крыс в тесте «Тредмил» (аналог теста шестиминутной ходьбы у человека) наблюдалось значимое ($p=0,0048$) улучшение у животных, получавших эмпаглифлозин с фозиноприлом, и значимое ухудшение при комбинировании спиронолактона с эмпаглифлозином (рис.).

Сравнение эхокардиографических показателей между группами представлены в таблице (уровень значимости — $p<0,05$).

В относительных значениях прирост фракции укорочения и фракции выброса составил около 25% в группе животных, получавших эмпаглифлозин с фозиноприлом, по отношению к группе ХСН без лечения.

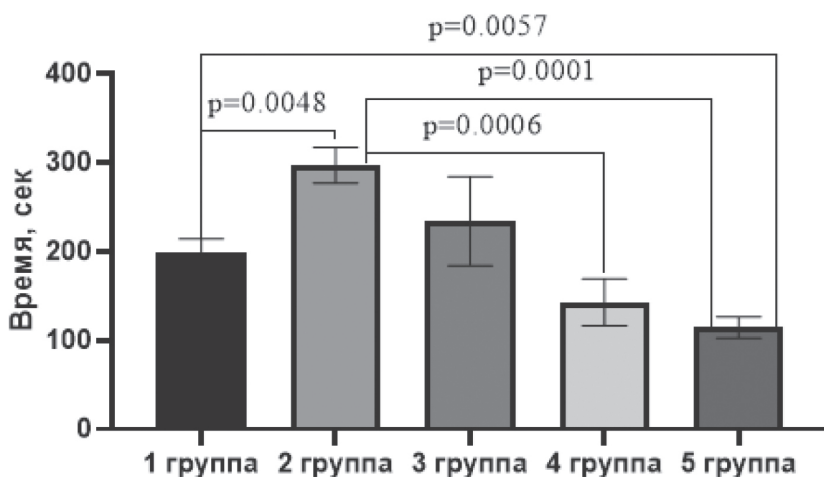


Рис. Результаты теста на тредмиле — время бега у животных через 3 мес. комбинированной терапии.
Fig. Results of the treadmill test — running time in animals after three months of combination therapy.

Таблица. Статистически значимые различия эхокардиографических данных между группами животных в конечной точке исследования

Table. Significant differences in echocardiographic findings between animal groups at the study endpoint

Группа	1	2	3	4	5
1		ППд: 1>2	КДРлж: 1>3 ФВ(Т): 1<3 ЛПд: 1>3	Тзс: 1>4	—
2	ППд: 1>2		—	КСРлж: 2<4 ФУ: 2>4 ФВ(Т): 2>4 ФВ(С): 2>4	—
3	КДРлж: 1>3 ФУ: 1<3 ФВ(Т): 1<3 ЛПд: 1>3	КДРлж: 2>3		КДРлж: 3<4 КСРлж: 3<4 ФУ: 3>4 ФВ(Т): 3>4 КДОлж: 3<4 КСОлж: 3<4 ФВ(С): 3>4	—
4	Тзс: 1>4	КСРлж: 2<4 ФУ: 2>4 ФВ(Т): 2>4 ФВ(С): 2>4	КДРлж: 3<4 КСРлж: 3<4 ФУ: 3>4 ФВ(Т): 3>4 КДОлж: 3<4 КСОлж: 3<4 ФВ(С): 3>4		—
5	—	—	—	—	

Примечание: КДОлж — конечный диастолический объём левого желудочка; КДРлж — конечный диастолический размер левого желудочка; КСОлж — конечный систолический объём левого желудочка; КСРлж — конечный систолический размер левого желудочка; ЛПд — левое предсердие в диастолу, ППд — правое предсердие в диастолу; Тзс — толщина задней стенки; ФВ(С) — фракция выброса по Симпсону; ФВ(Т) — фракция выброса по Тейхольцу; ФУ — фракция укорочения.

note: КДОлж — left ventricle volume during diastole; КДРлж — left ventricle internal diameter during diastole; КСОлж — left ventricle volume during systole; КСРлж — left ventricle internal diameter during systole; ЛПд — left atrium in diastole; ППд — right atrium in diastole; Тзс — left ventricle posterior wall; ФВ(С) — ejection fraction by Simpson; ФВ(Т) — ejection fraction by Teicholtz; ФУ — shortening fraction.

Выводы

Результаты исследования по совокупности показателей эхокардиографического исследования, толерантности к физической

нагрузке и выживаемости позволяют сделать вывод о наибольшей эффективности комбинации «эмпаглифлозин + фозиноприл».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. 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., Uspenskaaya 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 nedostatochnosti putem okklyuzii levoy koronarnoy arterii u kryss: tekhnika i metody morfofunktsional'noy otsenki. *Biomeditsina* [Journal Biomed]. 2014;3:32–48. (In Russian)].
2. 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 Schmiedebergs 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

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

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

Куликов Александр Николаевич, д.м.н., проф.,
ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский го-
сударственный 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



МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ РЕАКЦИЯ ОРГАНИЗМА ЛАБОРАТОРНЫХ КРЫС НА ЭКСТРЕМАЛЬНУЮ ГИПЕРТЕРМИЮ

А.Е. Ким^{1,*}, Е.Б. Шустов²

¹ ФГБВОУ ВПО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Минобороны России
194044, Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул. Лебедева, 6

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

Исследовалась динамика базовых показателей метаболизма и перекисного окисления липидов в сыворотке крови крыс в процессе формирования состояния гипертермии (воздействие воздуха с температурой +40°C длительностью 60 мин). Установлено, что альбумин/глобулиновый коэффициент, мочевая кислота, холестерин, триглицериды, электролиты крови, а также активность ферментов аланинаминотрансферазы, аспаргатаминотрансферазы, лактатдегидрогеназы, супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы в условиях кратковременного теплового воздействия не имели статистически достоверных отличий от значений в состоянии нормотермии. Уровень гидроперекисей липидов и восстановленного глутатиона достоверно меняется уже во время фазы мобилизации терморегуляторных механизмов. Динамика этих показателей — стабильная, что позволяет соотнести их с собственно гипертермией.

Ключевые слова: гипертермия, тепловой стресс, метаболизм, перекисное окисление липидов, антиоксидантная система

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Ким А.Е., Шустов Е.Б. Метаболическая реакция организма лабораторных крыс на экстремальную гипертермию. *Биомедицина*. 2024;20(3):80–83. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-3-80-83>

Поступила 08.04.2024

Принята после доработки 22.04.2024

Опубликована 10.09.2024

METABOLIC RESPONSE OF LABORATORY RATS TO EXTREME HYPERTHERMIA

Aleksey E. Kim^{1,*}, Evgeniy B. Shustov²

¹ Military Medical Academy named after S.M. Kirov of the Ministry of Defense of Russia
194044, Russian Federation, Saint Petersburg, Lebedeva Str., 6

² Golikov Research Clinical Center of Toxicology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia
192019, Russian Federation, Saint Petersburg, Bekhtereva Str., 1

The dynamics of basic parameters of metabolism and lipid peroxidation in the blood serum of rats was studied during the formation of a state of hyperthermia (exposure to air at a temperature of +40 °C for 60 min). It was found that the albumin/globulin ratio, uric acid, cholesterol, triglycerides, blood electrolytes, as well as the activity of the enzymes alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, lactate dehydrogenase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase under short-term heat exposure did not have statistically significant differences from the values in the state of normothermia. The level of lipid hydroperoxides and reduced glutathione changes significantly already during the mobilization phase of thermoregulatory

mechanisms. The dynamics of these indicators are stable, which allows these indicators to be correlated with hyperthermia itself.

Keywords: hyperthermia, heat stress, metabolism, lipid peroxidation, antioxidant system

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

For citation: Kim A.E., Shustov E.B. Metabolic Response of Laboratory Rats to Extreme Hyperthermia. *Journal Biomed.* 2024;20(3):80–83. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-3-80-83>

Submitted 08.04.2024

Revised 22.04.2024

Published 10.09.2024

Введение

Воздействие на организм человека высокой температуры, приводящее к развитию состояния гипертермии, — один из типовых экстремальных факторов, существенно влияющих на функциональное состояние и возможность выполнения профессиональной деятельности [3]. В литературе в основном описаны изменения показателей метаболизма на тепловое воздействие, но полученные разными авторами данные зачастую являются противоречивыми, что во многом связано с нестандартизированностью как самого теплового воздействия, так и разными уровнями сформированной в организме гипертермии [1, 2, 5].

В связи с этим **целью** исследования была конкретизация данных о метаболическом ответе организма в разные фазы формирования гипертермии.

Материалы и методы

20 белых крыс с введённым в прямую кишку ректальным температурным датчиком в индивидуальных фиксирующих пластиковых пеналах помещались в термостат, в котором поддерживались следующие условия: температура воздуха — +40°C, относительная влажность воздуха — 35–37%. Забор биологического материала у животных осуществлялся из хвостовой вены до начала гипертермии, а также на 20, 40 и 60-й мин теплового воздействия. Определение биохимических показателей производили

на биохимическом анализаторе А-25 фирмы «BioSystems» (Испания) с использованием наборов фирмы «BioSystems» и «Randox» (супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза). Определение показателей перекисного окисления липидов и активности ферментов антиоксидантной системы осуществляли в гемолизате эритроцитов [4].

Результаты и их обсуждение

Результаты определения основных метаболических показателей животных представлены в таблице.

Кластерный анализ позволил объединить изученные показатели метаболизма лабораторных животных в условиях экстремальной гипертермии в четыре группы, условно названных нами как «белковая», «печёночная», «электролитная», «антиоксидантная». В белковом кластере более тесно ассоциированы лактатдегидрогеназа, общий белок, мочевая кислота, альбумины и глобулины, для которых выявлены слабые положительные корреляционные связи. В то же время активность щелочной фосфатазы и альбумин/глобулиновый коэффициент с ядром этого кластера связаны отрицательными корреляционными связями. В структуре печёночного кластера ядро положительно коррелирующих показателей образуют аламинотрансфераза, мочевины, триглицериды, билирубин и креатинин, в то время как холестерин, натрий и щелочная фосфатаза образуют отрицательно коррелирующий полюс данного кластера. В электролит-

Таблица. Базовые показатели метаболизма у белых крыс в различные фазы перегревания в термокамере при температуре воздуха +40°C (средние по группе, $M \pm m$, $n=10$)

Table. Basic metabolic parameters in white rats during various phases of overheating in a thermal chamber at an air temperature of +40°C (group averages, $M \pm m$, $n=10$)

Показатель	Нормотермия	Гипертермия 40 мин	Гипертермия 60 мин
Белковый обмен			
Альбумины	37,7±2,4	33,0±2,0	32,5±1,5*
Глобулины	26,0±1,4	21,9±3,0*	23,9±1,0*
Общий белок	63±3	55±1**	53,5±2,5*
Креатинин	104±4,6	108±5,7	85±2,4*
Мочевина	7,1±1,7	3,6±0,5*	3,95±1,5*
Глюкоза	7,0±0,4	7,7±0,2*	6,9±0,7
Билирубин общий	11,9±7,8	9,8±8,1	6,2±2,0*
Щелочная фосфатаза	329±257	256±185	83±14**
Глутатионредуктаза	0,71±0,09	0,73±0,11	0,92±0,13 *
Гидроперекиси	27,3±0,7	43,5±1,4**	45,9±1,1**
Глутатион восстановленный	22,2±2,2	8,9±0,9*	8,9±0,9*
Малоновый диальдегид	15,9±1,0	18,3±1,2	18,9±1,2*

Примечание: в таблицу включены только показатели, имеющие достоверную динамику в ходе исследования. Отличия от группы интактных животных достоверны по критерию Вилкоксона — Манна — Уитни, * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$.

Note: the table includes only the parameters that showed reliable dynamics during the study. Differences from the group of intact animals are reliable according to the Wilcoxon — Mann — Whitney criterion, * — $p < 0.05$, ** — $p < 0.01$.

ном кластере более тесно коррелирующее ядро составляет аспаргатаминотрансфераза, калий и глюкоза, в то время как хлориды и кальций образуют отрицательно коррелирующий полюс этого кластера. Связующим звеном между белковым и печёночным кластерами является щелочная фосфатаза, что подчёркивает особую маркерную роль активности этого фермента при гипертермии. В антиоксидантном кластере положительный полюс был представлен супероксиддисмутазой и глутатионпероксидазой, отрицательный — гидроперекисями липидов.

Заключение

Выявленные изменения белкового обмена и активности ферментов свидетельствуют об активации в условиях гипертермии катаболизма белков на фоне угнетения их

синтеза и о высокой термолабильности ряда печёночных ферментов, в особенности щелочной фосфатазы, что позволяет рассматривать этот фермент как маркер ассоциированных с гипертермией нарушений метаболизма.

Показано, что уровень гидроперекисей липидов и восстановленного глутатиона достоверно меняются уже через 20 мин теплового воздействия, т. е. ещё во время первой фазы теплового воздействия — мобилизации терморегуляторных механизмов. Динамика этих показателей стабильная, что позволяет соотнести их с собственно гипертермией, а не реакцией на стрессовый стимул. Чем выше достигнутый уровень ректальной температуры животных, тем выше уровень гидроперекисей липидов и ниже уровень восстановленного глутатиона.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Козлов Н.Б. *Гипертермия: биохимические основы патогенеза, профилактики, лечения*. Воронеж: Изд-во Воронежского университета, 1990:102. [Kozlov N.B. *Gipertermiya: biokhimicheskie osnovy patogeneza, profilaktiki, lecheniya* [Hyperthermia: Biochemical basis of pathogenesis, prevention, treatment]. Voronezh: Izd-vo Voronezhskogo universiteta, 1990:102. (In Russian)].
2. Новиков В.С., Голянич В.В., Шустов Е.Б. *Физиология экстремальных состояний*. СПб.: Наука, 1998:247. [Novikov V.S., Golyanich V.V., Shustov E.B. *Fiziologiya ekstremal'nykh sostoyanii* [Physiology of extreme states]. Saint Petersburg: Nauka Publ., 1998:247. (In Russian)].
3. Новиков В.С., Сороко С.И., Шустов Е.Б. *Дезадаптационные состояния человека при экстремальных воздействиях и их коррекция*. СПб.: Политехника-принт, 2018:548. [Novikov V.S., Soroko S.I., Shustov E.B. *Dezadaptatsionnye sostoyaniya cheloveka pri ekstremal'nykh vozdeistviyakh i ikh korrektsiya* [Maladaptive states of a person under extreme influences and their correction]. Saint Petersburg: Politekhnik-a-print Publ., 2018:548. (In Russian)].
4. Портяная Н.И., Осипенко Б.Г., Москадынова Г.А., Новохатский Н.К., Гушина А.А., Черняк Ю.И., Добролюбова Б.А. *Биохимические исследования в токсикологическом эксперименте*. Иркутск: Изд-во Иркутского государственного университета, 1990:213. [Portyanaya N.I., Osipenko B.G., Moskadynova G.A., Novokhatskii N.K., Gushchina A.A., Chernyak Yu.I., Dobrolyubova B.A. *Biokhimicheskie issledovaniya v toksikologicheskom eksperimente* [Biochemical studies in a toxicological experiment]. Irkutsk: Izd-vo Irkutskogo gosudarstvennogo universiteta, 1990:213. (In Russian)].
5. Шепелев А.П. Влияние острого физического перегревания животных на процессы перекисного окисления липидов. *Вопросы медицинской химии*. 1976;22(1):47–51. [Shepelev A.P. Vliyanie ostrogo fizicheskogo peregrevaniya zhivotnykh na protsessy perekisnogo okisleniya lipidov [The influence of acute physical overheating of animals on the processes of lipid peroxidation]. *Voprosy meditsinskoj khimii* [Question of medical chemistry]. 1976;22(1):47–51. (In Russian)].

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Ким Алексей Евгеньевич*, к.м.н., доц., ФГБВОУ ВПО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Минобороны России;
e-mail: alexpann@mail.ru

Шустов Евгений Борисович, д.м.н., проф., ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии им. академика С.Н. Голикова ФМБА России»;
e-mail: shustov-msk@mail.ru

Aleksey E. Kim*, Cand. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Military Medical Academy named after S.M. Kirov of the Ministry of Defense of Russia;
e-mail: alexpann@mail.ru

Evgeniy B. Shustov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Golikov Research Clinical Center of Toxicology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: shustov-msk@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author



ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ У МЫШЕЙ

Д.С. Кульчановская^{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-Петербурге, ул. Льва Толстого, 6–8

В статье изложены результаты апробации модели формирования сердечной недостаточности у лабораторных животных путём однократного введения амилоидогена. В качестве биомоделей использовались белые беспородные мыши, которые были разделены на интактную и экспериментальную группы. Животным из экспериментальной группы однократно вводился амилоидоген, содержащий гомогенат миокарда мыши для воспроизведения выраженного кардиопатического эффекта. Структурно-функциональные изменения миокарда отслеживали при помощи эхокардиографии. Результаты исследования показали, что у животных из экспериментальной группы наблюдалось ремоделирование сердца по типу рестриктивной кардиомиопатии и сократительная дисфункция обоих желудочков, свидетельствующие о формировании сердечной недостаточности.

Ключевые слова: амилоидная кардиомиопатия, амилоидоген, сократительная дисфункция миокарда, гипертрофия левого желудочка

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Кульчановская Д.С., Черномордова А.В., Оковитый С.В., Куликов А.Н. Экспериментальное моделирование сердечной недостаточности у мышей. *Биомедицина*. 2024;20(3):84–88. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-3-84-88>

Поступила 15.04.2024

Принята после доработки 03.06.2024

Опубликована 10.09.2024

EXPERIMENTAL MODELING OF HEART FAILURE IN MICE

Daria S. Kulchanovskaya^{1,*}, Alexandra V. Chernomordova²,
Sergey V. Okovityi¹, Aleksandr 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 testing a heart failure model in laboratory animals by single administration of amyloidogen. White outbred mice were used as biomodels, which were divided into intact and experimental groups. Animals from the experimental group were once injected with amyloidogen containing mouse myocardial homogenate to reproduce a pronounced cardiopathic effect. Structural and functional changes of the myocardium were monitored using echocardiography. According to the results obtained,

animals in the experimental group demonstrated a remodeling of the heart similar to restrictive cardiomyopathy and a myocardial dysfunction of both ventricles, indicating the formation of heart failure.

Keywords: amyloid cardiomyopathy, amyloidogen, myocardial contractile dysfunction, left ventricular hypertrophy

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

For citation: Kulchanovskaya D.S., Chernomordova A.V., Okovityi S.V., Kulikov A.N. Experimental Modeling of Heart Failure in Mice. *Journal Biomed.* 2024;20(3):84–88. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-3-84-88>

Submitted 15.04.2024

Revised 03.06.2024

Published 10.09.2024

Введение

По данным Всемирной организации здравоохранения, болезни сердца остаются лидирующей причиной смертности во всём мире на протяжении 20 лет, поэтому поиск и изучение новых методов лечения сердечно-сосудистых заболеваний является актуальной задачей современной медицины. Сердечная недостаточность является наиболее распространённым клиническим синдромом, возникающим как исход многих сердечно-сосудистых расстройств [3]. Для разработки новых методов профилактики и терапии сердечной недостаточности необходимо использовать релевантную экспериментальную модель с соответствующими патологическими изменениями сердца. Амилоидоз сердца (амилоидная кардиомиопатия) — поражение сердца, обусловленное внеклеточным отложением амилоида — фибриллярных белковых структур. Иногда процесс может быть локальным, например, амилоидоз предсердий, но чаще поражение сердца является элементом генерализованного процесса, вызванным опухолевым ростом, метаболическими нарушениями или системным воспалением [1]. Амилоидоз сердца – одна из причин развития тяжёлой, часто рефрактерной к лечению сердечной недостаточности рестриктивного типа.

Целью настоящего исследования является воспроизведение амилоидной модели формирования сердечной недостаточности путём однократного введения амилоидогена, с последующей оценкой формирования патологии сердца.

Материалы и методы

Для моделирования амилоидоза системного типа был выбран метод, предполагающий введение мышам амилоидогена в виде смеси, состоящей из нативного альбумина, полного адьюванта Фрейнда и гомогената миокарда мышей. В литературных источниках упоминается альтернативная методика моделирования без добавления гомогената миокарда сердца. Обе модели проявляются системным амилоидозом с преимущественным поражением сердца, почек, печени и селезёнки, однако первый метод характеризуется наиболее выраженной альтерацией тканей сердца за счёт добавления гомогената миокарда, что связано с формированием аутоиммунного звена в патогенезе кардиомиопатии [2].

В исследовании использовались беспородные самки лабораторных мышей массой на начало эксперимента 18–25 г. Животные поступили из питомника лабораторных животных «Рапполово» (Ленинградская обл.). Животных содержали в виварии в соответ-

ствии 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».

Животные были разделены на интактную и экспериментальную группы (по 10 особей в каждой). Экспериментальным животным однократно вводили амилоидоген в виде смеси, состоящей из нативного альбумина (40%), полного адьюванта Фрейнда (40%) и гомогената миокарда (20%), по 0,05 мл подкожно в 4 точки, расположенные в паховых и подмышечных областях, а также 0,05 мл внутривенно. Динамику структур и функциональных характеристик миокарда у животных обеих групп отслеживали при помощи эхокардиографии (ЭхоКГ), которую выполняли дважды:

исходно (1-я точка) и через 4 недели (2-я точка) после введения амилоидогена.

ЭхоКГ выполняли с помощью ультразвуковой системы «Esaote MyLab». Исследование животных проводили при наркотизации хлоргидратом в дозировке 350 мг/кг. В М-режиме регистрировали: конечные диастолический и систолический размеры левого желудочка (КДРлж, КСРлж, мм); толщину межжелудочковой перегородки (Тмжп, мм) и толщину задней стенки левого желудочка (Тзс, мм); плоскостную систолическую экскурсию митрального кольца (MAPSE), плоскостную систолическую экскурсию кольца трикуспидального клапана (TAPSE). В В-режиме регистрировали: поперечный и вертикальные размеры левого и правого предсердия (ЛПп, ЛПв, ППп, ППв, мм), поперечный размер левого и правого желудочка (ПЖп, ЛЖп, мм).

Таблица. Динамика ЭхоКГ-показателей в опытной и контрольной группах
Table. Dynamics of EchoCG parameters in experimental and control groups

Показатели	Амилоидоз		Контроль	
	1-я точка	2-я точка	1-я точка	2-я точка
Масса, мг	22,00±1,56	25,90±2,08 ²	22,78±2,05 ²	25,78±2,39
КДРлж, мм	3,73±0,28	3,54±0,17	3,65±0,36	3,61±0,33
КСРлж, мм	2,10±0,29	2,16±0,26	2,08±0,31	2,16±0,33
Тмжп, мм	0,86±0,24	1,15±0,16 ^{2,3}	0,83±0,24	0,84±0,08
Тзс, мм	0,68±0,19	0,80±0,19	0,79±0,13	0,64±0,12
ФУ, %	43,84±5,56	35,76±2,20 ⁴	44,13±6,12	40,36±5,22
ФВ, %	80,71±5,40	72,14±2,83 ⁴	80,94±5,99	77,17±5,83
ПЖп, мм	1,86±0,19	2,10±0,11 ⁴	1,81±0,22	1,93±0,22
ЛЖп, мм	2,24±0,26	2,28±0,21	2,04±0,27	2,16±0,13
MAPSE	0,69±0,15	0,60±0,08 ²	0,71±0,11	0,86±0,15
TAPSE	1,12±0,15	0,78±0,11 ^{2,4}	1,07±0,07	1,01±0,16
ЛПп, мм	2,65±0,19	2,86±0,27 ²	2,63±0,27	2,46±0,27
ЛПв, мм	3,07±0,32	2,89±0,22 ²	2,99±0,29	2,57±0,25
ППп, мм	1,97±0,23	2,13±0,27	2,00±0,20	1,92±0,19
ППв, мм	2,38±0,53	2,48±0,17 ¹	2,36±0,14	2,20±0,17

Примечание: данные представлены в виде $M \pm m$, где M — среднее арифметическое показателя в группе, m — среднеквадратическое отклонение. В надстрочном индексе: ¹ — $p < 0,05$ в сравнении с группой контроля (2-я точка); ² — $p < 0,01$ в сравнении с группой контроля (2-я точка); ³ — $p < 0,05$ в сравнении с экспериментальной группой (1-я точка); ⁴ — $p < 0,01$ в сравнении с экспериментальной группой (1-я точка).

Note: data are presented as $M \pm m$, where M — arithmetic mean of the index in the group, m — standard deviation. In superscript: ¹ — $p < 0.05$ in comparison with the control group (point 2); ² — $p < 0.01$ in comparison with the control group (point 2); ³ — $p < 0.05$ in comparison with the experimental group (point 1); ⁴ — $p < 0.01$ in comparison with the experimental group (point 1).

Рассчитывали: показатели сократимости левого желудочка — фракцию укорочения (ФУ, %) и фракцию выброса (ФВ, %).

Статистический анализ данных проводили с использованием программного пакета GraphPad Prism 8 («GraphPad Software», США). Проверялась гипотеза о нормальности распределения признаков с помощью теста Андерсона — Дарлинга, для оценки различий между выборками с нормальным распределением применяли двусторонний дисперсионный анализ повторных измерений Mixed Model, в качестве апостериорного теста был выбран тест Шидака.

Результаты и их обсуждение

Исходно обследуемые группы животных не отличались по величине массы тела и эхокардиографическим показателям. За период наблюдения у животных интактной группы отмечалось увеличение массы тела, но структурные и функциональные показатели сердца не изменились. У животных экспериментальной группы через 4 недели (2-я точка) также наблюдалось достоверное увеличение массы тела, но после введения амилоидогена отмечены выраженные изменения структуры и функции

сердца (табл.). Произошло значимое увеличение толщины межжелудочковой перегородки (Тмжп) и ухудшение показателей сократимости левого и правого желудочка (ФУ, ФВ и TAPSE). В сравнении с группой контроля у мышей исследуемой группы отмечено существенное увеличение размеров предсердий (ЛПп, ЛПв, ППв) и снижение показателей продольной сократимости обоих желудочков (MAPSE, TAPSE).

Таким образом, ремоделирование сердца в экспериментальной группе характеризовалось концентрической гипертрофией левого желудочка в сочетании с увеличенными предсердиями, что характерно для рестриктивной кардиомиопатии. Признаки сократительной дисфункции миокарда свидетельствуют в пользу формирования сердечной недостаточности.

Выводы

Введение амилоидогена мышам привело к структурно-функциональной перестройке сердца, типичной для амилоидной кардиомиопатии. Указанная модель может быть использована для исследования механизмов формирования рестриктивной сердечной недостаточности и подходов к её лечению.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Резник Е.В., Нгуен Т.Л., Степанова Е.А., Устюжанин Д.В., Никитин И.Г. Амилоидоз сердца: взгляд терапевта и кардиолога. *Архив внутренней медицины*. 2020;10(6):430–457. [Reznik E.V., Nguyen T.L., Stepanova E.A., Ustyuzhanin D.V., Nikitin I.G. Amiloidoz serdtsa: vzglyad terapevta i kardiologa [Cardiac amyloidosis: A therapist and cardiologist's view]. *Arkhiv vnutrenney meditsiny [Archives of Internal Medicine]*. 2020;10(6):430–457. (In Russian)]. DOI: 10.20514/2226-6704-2020-10-6-430-457
2. Соколовский Н.В., Брин В.Б., Козырев К.М., Кабисов О.Т. Сравнительная оценка двух моделей экспериментального кардиопатического амилоидоза. *Кубанский научный медицинский вестник*. 2015;(3):101–105. [Sokolovsky N.V., Brin V.B., Kozurev K.M., Kabisov O.T. Sravnitel'naya otsenka dvukh modeley eksperimental'nogo kardiopaticheskogo amiloidoza [Comparative evaluation of two models of experimental cardiopathic amyloidosis]. *Kubanskiy nauchnyy meditsinskiy vestnik [Kuban Scientific Medical Bulletin]*. 2015;(3):101–105. (In Russian)].
3. McDonagh T.A., Marco M., Adamo M., Gardner R.S., Baumbach A., Böhm M., Burri H., Butler J., Čelutkienė J., Chioncel O., Cleland J.G.F., Coats A.J.S., Crespo-Leiro M.G., Farmakis D., Gilard M., Heymans S., Hoes A.W., Jaarsma T., Jankowska E.A., Lainscak M., Lam C.S.P., Lyon A.R., McMurray J.J.V., Mebazaa A., Mindham R., Muneretto C., Francesco Piepoli M., Price S., Rosano G.M.C., Ruschitzka F., Kathrine Skibelund A.; ESC Scientific Document Group. 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *European Heart Journal*. 2021;(42):3599–3726. DOI: 10.1093/eurheartj/ehab368

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Кульчановская Дарья Сергеевна*, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России;
e-mail: darya.kulchanovskaya@spcpcu.ru

Daria S. Kulchanovskaya*, Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: darya.kulchanovskaya@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. 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

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

Aleksandr 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

ПРОФИЛАКТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ПОЛИПРЕНОЛОВ ИЗ ХВОИ ПИХТЫ СИБИРСКОЙ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ НЕБЛАГОПРИЯТНЫХ ФАКТОРОВ

М.В. Мельникова*, Е.Б. Шустов, Е.А. Золотоверхая, Л.Г. Кубарская, А.А. Бондаренко,
А.В. Бельская, А.А. Ватаева

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

В настоящее время биологически активные вещества природного происхождения получили широкое применение в качестве средств профилактического действия. Продолжается поиск и разработка новых препаратов для профилактики и коррекции неспецифических нарушений резистентности организма к неблагоприятным воздействиям окружающей среды. Проведена доклиническая оценка эффективности полипrenoлов из пихты сибирской *Abies sibirica* при профилактическом применении в течение двух недель. Показано, что действие полипrenoлов проявляется антиоксидантной, анаболической активностью и стимуляцией кроветворения на экспериментальной модели комбинированного отравления карбендазимом и рентгеновским облучением.

Ключевые слова: *Abies sibirica*, полипrenoлы, карбендазим, рентгеновское излучение

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: работа была проведена в рамках Государственного задания Федерального медико-биологического агентства № 388-00113-21-00 (код 64.003.21.800).

Для цитирования: Мельникова М.В., Шустов Е.Б., Золотоверхая Е.А., Кубарская Л.Г., Бондаренко А.А., Бельская А.В., Ватаева А.А. Профилактические эффекты полипrenoлов из хвои пихты сибирской при воздействии неблагоприятных факторов. *Биомедицина*. 2024;20(3):89–93. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-3-89-93>

Поступила 08.04.2024

Принята после доработки 22.04.2024

Опубликована 10.09.2024

PREVENTIVE EFFECTS OF POLYPRENOLS FROM THE NEEDLES OF *ABIES SIBIRICA* UNDER THE INFLUENCE OF ADVERSE FACTORS

Margarita V. Melnikova*, Evgeniy B. Shustov, Ekaterina A. Zolotoverkhaya,
Larisa G. Kubarskaya, Anastasiya A. Bondarenko, Alisa V. Belskaya, Alena A. Vataeva

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

Currently, biologically active substances of natural origin are widely used as preventative agents. The search and development of new drugs for the prevention and correction of nonspecific disorders of the body's resistance to adverse effects in environment continues. A preclinic assessment of the effectiveness of poly-prenols from Siberian fir *Abies sibirica* was carried out when used prophylactically for two weeks. It has been shown that the effect of poly-prenols is manifested by antioxidant, anabolic activity and stimulation of hematopoiesis in an experimental model of combined poisoning with carbendazim and X-ray irradiation.

Keywords: *Abies sibirica*, polyprenols, carbendazim, X-ray irradiation

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

Funding: this work was performed in the framework of State task of the Federal Medical Biological Agency of Russia No. 388-00113-21-00 (code 64.003.21.800).

For citation: Melnikova Margarita V., Shustov E.B., Zolotovkhnaya E.A., Kubarskaya L.G., Bondarenko A.A., Belskaya A.V., Vataeva A.A. Preventive Effects of Polyprenols from the Needles of *Abies sibirica* under the Influence of Adverse Factors. *Journal Biomed.* 2024;20(3):89–93. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-3-89-93>

Submitted 08.04.2024

Revised 22.04.2024

Published 10.09.2024

Введение

В повседневной жизни значительная часть населения крупных городов подвергается воздействию низких доз химического и электромагнитного загрязнения [4]. В связи с этим представляют интерес поиск и разработка новых подходов и препаратов для профилактики и коррекции неспецифических нарушений резистентности организма к неблагоприятным воздействиям окружающей среды. Актуально изучение возможности использования препаратов растительного происхождения. Особое место в ряду промышленных источников биологически активных веществ занимают представители растительного мира Сибири, Алтая и Дальнего Востока. Объектом исследования в настоящей работе являлись полипренолы из хвои пихты сибирской *Abies sibirica*.

Цель исследования — изучение эффективности полипренолов при комбинированном моделировании на крысах отравления карбендазимом и рентгеновским облучением.

Материалы и методы

В исследовании были использованы белые беспородные крысы-самцы массой 180–220 г, источник — питомник «Рапполово» НИЦ «Курчатовский институт» (Ленинградская обл.). Продолжительность карантина составила 14 дней. Животных содержали в стандартных условиях в соот-

ветствии с ГОСТ 33215-2014 от 01.07.2016 г. и ГОСТ 33044-2014 от 01.08.2015 г. Протокол исследования был одобрен биоэтической комиссией ФГБУ «НКЦТ им. акад. С.Н. Голикова ФМБА России».

Лабораторные животные были распределены на 3 группы по 10 животных: 1) интактная, 2) карбендазим + облучение, 3) полипренол + карбендазим + облучение. Моделирование комбинированного действия проводили путём внутрижелудочного зондового введения водного р-ра карбендазима (фунгицид «Комфорт КС», ООО «Листерра», Россия) в дозе 400 мг/кг ежедневно в течение 28 дней. Рентгеновское облучение животных осуществлялось на 7, 14 и 21-й день в дозе 20 сГр, на 28-й день — в дозе 80 сГр; суммарная фракционная доза составила 1,4 Гр [2]. Облучение проводили на установке «Многофункциональная передвижная рентгеновская установка» (ЗАО «ЭЛТЕХ-Мед», Россия).

Фармакологическую коррекцию осуществляли с 15-го по 29-й день исследования путём ежедневного внутрижелудочного введения концентрата полипренолов из хвои пихты *Abies sibirica* («Пренолит» 90%, ООО «Солагифт», Россия) в дозе 5 мг/кг. В качестве носителя использовали подсолнечное масло.

В динамике оценивали показатели клинического осмотра, массы тела, кормо- и водопотребления лабораторных животных. Однократно на 30-й день исследования

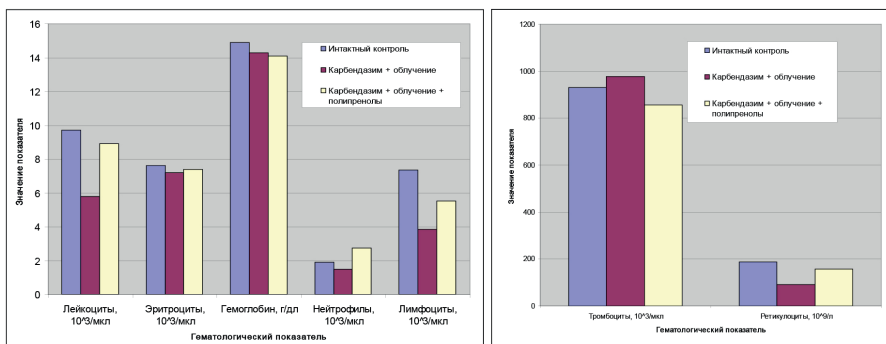


Рис. Влияние курсового введения полипrenoлов на гематологические показатели лабораторных животных при комбинированном отравлении карбендазимом и рентгеновским облучением.

Fig. The influence of a course of administration of polyphenols on the hematological parameters of laboratory animals with combined poisoning with carbendazim and X-ray irradiation.

производили забор крови для определения гематологических показателей, устойчивости эритроцитарных мембран (ЭМ) к гемолизу [3], показателей перекисного окисления липидов (ПОЛ) и антиоксидантной системы (АОС) [1].

Результаты и их обсуждение

Экспериментальная модель комбинированного неблагоприятного воздействия характеризовалась выраженным снижением уровня лейкоцитов и ретикулоцитов, умеренным снижением прироста массы тела и потребления корма, активности супероксиддисмутазы (СОД) и глутатионтрансферазы (ГТ), слабым снижением потребления воды, уровня эритроцитов и гемоглобина, перекисной резистентности ЭМ.

Установлено, что полипrenoлы способны частично компенсировать изменения, вызванные карбендазимом и рентгеновским облучением. Клиническое состояние животных, получавших полипrenoлы, было удовлетворительным на протяжении всего эксперимента, показатель массы тела крыс имел тенденцию к равномерному увеличению на протяжении всего исследования. Полипrenoлы пихты повышали потребление корма, сниженное комбинированным отравлением.

Введение полипrenoлов на фоне воздействия способствовало увеличению перекис-

ной резистентности эритроцитов на 12%, повышению активности СОД — на 59%, глутатионпероксидазы (ГП) — на 36% и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Гл-6-ФДГ) — на 20%, что характеризует частичное восстановление функционального состояния животных. Также это подтверждается статистически значимым повышением уровня лейкоцитов на 54%, нейтрофилов — на 84%, лимфоцитов — на 44% и ретикулоцитов — на 75% (рис.).

В то же время отмечались и некоторые негативные эффекты — прооксидантная активность (повышение уровня диеновых конъюгатов), повышение уровня спонтанного гемолиза, но по степени выраженности они были слабыми, на уровне статистических тенденций, и, возможно, связаны с неоптимальной дозой исследуемого комплекса полипrenoлов.

Выводы

Таким образом, действие полипrenoлов проявляется антиоксидантной, анаболической активностью и стимулирующей кроветворения. Полипrenoлы из хвои пихты сибирской *Abies sibirica* оказывают неспецифическое повышение уровня резистентности организма при экспериментальном моделировании отравления карбендазимом и рентгеновским облучением.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Мельникова М.В., Кашуро В.А., Батоцыренова Е.Г., Кубарская Л.Г., Золотоверхая Е.А., Колбасова Т.А., Вакуненко О.А., Гладчук А.С. Влияние экстракта *Saccharina latissima* на показатели антиоксидантной системы крови крыс после отравления карбендазимом. *Биомедицина*. 2022;18(3):113–117. [Melnikova M.V., Kashuro V.A., Batotsyrenova E.G., Kubarskaya L.G., Zolotoverkhaia E.A., Kolbasova T.A., Vakunenkova O.A., Gladchuk A.S. Vliyaniye ekstrakta *Saccharina latissima* na pokazateli antioksidantnoy sistemy krovi krys posle otravleniya karbendazimom [Effect of *Saccharina latissima* extract on the antioxidant system parameters of rat blood after exposure to carbendazim]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2022;18(3):113–117. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-18-3-113-117
2. Мельникова М.В., Шустов Е.Б., Бельская А.В., Бондаренко А.А., Шемаев М.Е., Мелехова А.С., Ватаева А.А., Мастерова К.В. Разработка биомедицинской модели сочетанного воздействия низких доз химического и электромагнитных факторов. *Системы контроля окружающей среды* — 2022. Севастополь: ИП Куликов А.С., 2022. [Melnikova M.V., Shustov E.B., Belskaya A.V., Bondarenko A.A., Shemaev M.E., Melekhova A.S., Vataeva A.A., Masterova K.V. Razrabotka biomeditsinskoj modeli sochetannogo vozdeystviya nizkikh doz khimicheskogo i elektromagnitnykh faktorov [Development of a biomedical model of the combined effects of low doses of chemical and electromagnetic factors]. *Sistemy kontrolya okruzhayushchey sredy* — 2022 [Environmental control systems – 2022]. Sevastopol: I.P. Kulikov A.S. Publ., 2022. (In Russian)].
3. Мельникова М.В., Шустов Е.Б., Кубарская Л.Г., Бельская А.В., Бондаренко А.А., Мелехова А.С., Подольская Е.П., Краснов К.А. Изучение влияния биологически активных веществ бурых водорослей на стойкость эритроцитарных мембран. *Биомедицина*. 2021;17(3E):151–155. [Melnikova M.V., Shustov E.B., Kubarskaya L.G., Belskaya A.V., Bondarenko A.A., Melekhova A.S., Podolskaya E.P., Krasnov K.A. Izuchenie vliyaniya biologicheskii aktivnykh veshchestv burykh vodorosley na stoykost' eritrotsitarnykh membran [Effects of biologically active substances from brown algae on the resistance of erythrocyte membranes]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2021;17(3E):151–155. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2713-0428-17-3E-151-155
4. Шустов Е.Б., Мельникова М.В., Зорина В.Н., Мелехова А.С., Бельская А.В., Бондаренко А.А. Теоретические аспекты взаимодействия химического и физического неблагоприятного воздействия в условиях комбинированного экологического загрязнения. *Вестник образования и развития науки Российской академии естественных наук*. 2022;26(4):83–94. [Shustov E.B., Melnikova M.V., Zorina V.N., Melekhova A.S., Belskaya A.V., Bondarenko A.A. Teoreticheskie aspekty vzaimodeystviya khimicheskogo i fizicheskogo neblagopriyatnogo vozdeystviya v usloviyakh kombinirovannogo ekologicheskogo zagryazneniya [Theoretical aspects of the interaction by chemical and physical adverse effects in conditions of the combined environmental pollution]. *Vestnik obrazovaniya i razvitiya nauki Rossiyskoy akademii estestvennykh nauk [Herald of education and science development of Russian Academy of Natural Sciences]*. 2022;26(4):83–94. (In Russian)]. DOI: 10.26163/RAEN.2022.50.76.011

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Мельникова Маргарита Викторовна*, ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова ФМБА России»;
e-mail: margarita10108@mail.ru

Шустов Евгений Борисович, д.м.н., проф., ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова ФМБА России»;
e-mail: shustov-msk@mail.ru

Золотоверхая Екатерина Андреевна, ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова ФМБА России»;
e-mail: e.zolotoverkhaja@yandex.ru

Margarita V. Melnikova*, Golikov Research Clinical Center of Toxicology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: margarita10108@mail.ru

Evgeniy B. Shustov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Golikov Research Clinical Center of Toxicology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: shustov-msk@mail.ru

Ekaterina A. Zolotoverkhaya, Golikov Research Clinical Center of Toxicology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: e.zolotoverkhaja@yandex.ru

Кубарская Лариса Георгиевна, ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова ФМБА России»;
e-mail: larkub@yandex.ru

Larisa G. Kubarskaya, Golikov Research Clinical Center of Toxicology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: larkub@yandex.ru

Бондаренко Анастасия Александровна, ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова ФМБА России»;
e-mail: bondarenko-nastua@yandex.ru

Anastasiya A. Bondarenko, Golikov Research Clinical Center of Toxicology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: bondarenko-nastua@yandex.ru

Бельская Алина Владимировна, ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии имени 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

Ватаева Алена Андреевна, ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова ФМБА России»;
e-mail: pabo-elti@mail.ru

Alena A. Vataeva, Golikov Research Clinical Center of Toxicology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: pabo-elti@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author



N-КАРБАМОИЛГЛУТАМАТ ПРОФИЛАКТИРУЕТ ИНТОКСИКАЦИЮ АММИАКА У ПОРОСЯТ СО СНИЖЕННОЙ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ МАССОЙ ПЕЧЕНИ

К.С. Остренко

*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

Конечным продуктом катаболизма белка является аммиак, который оказывает угнетающее воздействие на нейроны. Обезвреживание аммиака у млекопитающих происходит в орнитинном цикле, регуляция активности которого в основном осуществляется на уровне синтеза N-карбамоилфосфата. Цикл Кребса сопряжён с орнитинным циклом через общий субстрат — аргининсукцинат, поэтому эффекты нейтрализации аммиака, процессы аминокислотного и энергетического обмена в значительной степени взаимосвязаны. Цель данного исследования — оценить эффективность применения добавки N-карбамоилглутамата для оптимизации обменных процессов и повышения нейтрализации аммиака у поросят-сосунов. Опыт проведён на двух группах поросят (n=15), сформированных в суточном возрасте. Водный раствор препарата выпаивали опытной группе в дозе 10 мг/кг массы тела однократно ежедневно. Продолжительность скармливания добавки — 30 сут, среднесуточный прирост живой массы определяли при отъёме в возрасте 30 сут. Анализ биохимического состава крови проведён на 30-е сут от начала опыта. По окончании скармливания добавки в опытной группе выявлено снижение содержания аммиака ($p<0,05$) и мочевины в плазме крови, увеличение концентрации аргинина ($p<0,05$) и триацилглицеролов ($p<0,05$) в сравнении с контрольной группой. Заключение, что применение добавки N-карбамоилглутамата способствует эндогенной продукции незаменимой аминокислоты аргинина, нейтрализации аммиака, образующегося в метаболических процессах, а также экономии затрат метаболической энергии на связывание аммиака в цикле мочевинообразования.

Ключевые слова: поросята-сосуны, кормовые добавки, N-карбамоилглутамат, нейтрализация аммиака, эндогенный синтез аргинина

Конфликт интересов: автор заявил об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Остренко К.С. N-карбамоилглутамат профилактирует интоксикацию аммиака у поросят со сниженной функциональной массой печени. *Биомедицина*. 2024;20(3):94–99. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-3-94-99>

Поступила 10.04.2024

Принята после доработки 03.06.2024

Опубликована 10.09.2024

N-CARBAMOYL GLUTAMATE PREVENTS AMMONIA INTOXICATION IN PIGLETS WITH REDUCED LIVER FUNCTION

Konstantin S. Ostrenko

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

Ammonia as the end product of protein catabolism has a depressing effect on neurons. Ammonia neutralization in mammals occurs in the ornithine cycle, the activity of which is regulated mainly at the level of synthesis of N-Carbamoyl phosphate. The Krebs cycle is coupled with the ornithine cycle through a common substrate—arginine succinate. Therefore, the effects of ammonia neutralization and the processes of amino acid and energy metabolism are largely interrelated. This study is aimed at evaluating the efficacy of an N-carbamoyl glutamate additive in terms of optimizing metabolic processes and improving ammonia neutralization in suckling piglets. The experiment was conducted on two groups of piglets (n=15) formed at the age of 24 hours. Piglets in the experimental group were fed with an aqueous solution of the drug at a dose of 10 mg/kg of body weight once daily. The duration of feeding the supplement was 30 days; the average daily gain in body weight was determined at weaning at the age of 30 days. An analysis of the blood biochemical composition was carried out on the 30th day from the onset of the experiment. At the end of feeding the supplement in the experimental group, a decrease in the content of ammonia (p<0.05) and urea in blood plasma, an increase in the concentration of arginine (p<0.05) and triacylglycerols (p<0.05) in comparison with the control group was revealed. The N-carbamoyl glutamate additive under study stimulates the endogenous production of the arginine essential amino acid, neutralizes ammonia formed in metabolic processes, and optimizes the amount of metabolic energy spent on binding ammonia in the urea cycle.

Keywords: suckling pigs, feed additives, N-Carbamoyl glutamate, ammonia neutralization, endogenous arginine synthesis

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

For citation: Ostrenko K.S. N-Carbamoyl Glutamate Prevents Ammonia Intoxication in Piglets with Reduced Liver Function. *Journal Biomed.* 2024;20(3):94–99. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-3-94-99>

Submitted 10.04.2024

Revised 03.06.2024

Published 10.09.2024

Введение

Врождённые ошибки уреагенеза представляют собой группу наследственных заболеваний, при которых имеется дефект фермента или транспортёра, влияющий на выработку или перемещение биохимических промежуточных продуктов метаболического пути, ответственного за утилизацию избыточного азота. Серьёзные медицинские проблемы могут возникнуть из-за чрезмерного накопления токсичных метаболитов, таких как аммиак или другие соединения. Детоксикация аммиака посредством цикла мочевины в перипортальных гепатоцитах является основным путём утилизации азота в виде мочевины, которая выводится с мочой [5]. В утилизации

азота через цикл мочевины участвуют семь ферментов, включая карбоангидразу VA (CAVA), N-ацетилглутаматсинтазу (NAGS), карбамоилфосфатсинтазу 1 (CPS1) и орнитинтранскарбамилазу (ОТС), аргининосукцинатсинтазу (ASS), аргининосукцинатлиазу и аргиназу. Дефицит любого из этих ферментов или транспортёров, кодируемых *SLC25A13* или *SLC25A15*, приводит к нарушению цикла мочевины. Нарушение цикла мочевины (НЦМ) может привести к гипераммониемии, приводящей к энцефалопатии, судорогам, коме и смерти. Гипераммониемия является одним из наиболее значимых и опасных для жизни последствий метаболической декомпенсации у пациентов, особенно в раннем постна-

тальном онтогенезе, но она может возникать и у пациентов с другими врождёнными нарушениями обмена веществ вследствие вторичного угнетения цикла мочевины и дефицита субстрата. В результате вторичной дисфункции цикла мочевины значительная гипераммониемия может наблюдаться при органических ацидемиях, дефектах окисления жирных кислот, нарушениях обмена аминокислот и токсичности вальпроевой кислоты. Надлежащий контроль аммиака является важной частью медицинского лечения (НЦМ), и за последние десятилетия были вложены значительные усилия в разработку новых методов лечения. У новорождённых с недостаточной массой тела риск развития гипераммониемии возрастает в связи с недостаточно развитой печенью как по массе, так и по функциональной активности.

Первый случай дефицита НМЦ был описан в 1981 г. у младенца мужского пола из Швейцарии, в семейном анамнезе которого была младенческая смертность его братьев и сестёр от гипераммониемии. Биохимический профиль этого пациента предполагал блокаду цикла мочевины проксимальнее ОТС, и диагноз был подтверждён неопределяемой активностью фермента NAGS в ткани печени при биопсии, в то время как активность CPS1 была интактной [4]. Впоследствии у новорождённого был выявлен ещё один случай дефицита НМЦ с аналогичной летальной картиной [3]. С тех пор во всём мире было зарегистрировано более 50 пациентов [6, 13]. Интересно, что клинические симптомы дефицита NAGS разнообразны: от раздражительности, рвоты и вялости до поведенческих нарушений. Как правило, у пациентов с тяжёлой формой заболевания в неонатальном периоде появляются симптомы гипераммониемической энцефалопатии, тогда как более лёгкие случаи проявляются во взрослом возрасте нейropsychиатрическими или поведенческими симптомами [6]. Недавнее

когортное и биохимическое исследование выявило, что мутации в домене ацетилтрансферазы (GNAT) встречаются чаще, чем в другом домене кинетической аминокислотной киназы [13]. Кроме того, мутации, затрагивающие домен GNAT, более вредны и вызывают тяжёлую неонатальную форму [13]. Из-за редкости распространённость этого расстройства неясна, но распределение случаев является панэтническим [1, 6]. Истинная частота заболевания, вероятно, недооценена по разным причинам: скрининг новорождённых с помощью tandemной масс-спектрометрии не выявляет дефицит НМЦ, люди с лёгким поражением могут годами не иметь симптомов, а люди с тяжёлым поражением могут умереть, не будучи диагностированы. Клиническая и биохимическая картина дефицита НМЦ может быть неотличима от дефицита CPS1, и молекулярно-генетический анализ особенно полезен для подтверждения диагноза дефицита НМЦ, заменяя ферментативный анализ в качестве предпочтительного метода подтверждения [10].

Традиционно лечение гипераммониемии у пациентов с НМЦ включает диетическое ограничение белка для уменьшения потока азота и назначение препаратов, поглощающих аммиак, таких как бензоат, фенилацетат и фенилбутират, для отвода избыточного азота в нетоксичный пул выводимых метаболитов [11, 12]. Несмотря на развитие этих терапевтических подходов, полной терапии НМЦ не существует, за исключением трансплантации печени, которая показана при более тяжёлом проксимальном дефиците CPS1, ОТС и ASS1. N-карбамоил-глутаминовая кислота (NCG), структурный аналог N-ацетилглутамата (NAG), используется для лечения дефицита NAGS с самого описания этого НМЦ [8, 9]. Непосредственно заменяя NAG, который является важным активатором фермента CPS1, без которого этот фермент неактивен [7], NCG действует как почти лечебное

лекарство при дефиците NAGS. Кроме того, учитывая его способность действовать как активатор цикла мочевины, NCG был предложен в качестве потенциальной терапии вторичной гипераммониемии, вызванной органическими ацидемиями, печёночной энцефалопатией и гипераммониемией, вызванной вальпроатом [2, 7, 14].

Цель исследования — на модели поросят-сосунов с низкими весовыми показателями при опоросе изучить физиологические эффекты NCG в контексте его влияния на орнитинный цикл и возможность использования для лечения НМЦ.

Материалы и методы

Для проведения исследования было сформировано две группы поросят по 15 гол. в каждой на 8-е сут после опороса. В качестве критерия отбора служили показатели живой массы тела, отбирались поросята с низкими индексами массы тела. Поросята опытной и контрольной группы находились в своём гнезде, но были промаркированы ушными метками. Условия содержания для групп были идентичны. Препарат N-карбамоилглутамата (NCG) растворяли в 5 мл воды и вводили в дозировке 10 мг/кг массы тела однократно ежедневно перорально в течение 30 сут. Контрольная группа получала питьевую воду в том же объёме. Водный р-р N-карбамоилглутамата (NCG) выпаивали одновременно с суточного возраста. Для оценки действия NCG на приросты массы тела определяли живую массу в начале опыта и по завершении эксперимента в возрасте 30 сут. Отбор проб крови проводили через 30 дней после введения препарата.

Для изучения действия препарата в сыворотке крови свиней на 30-е сут после опороса определяли концентрацию мочевины, креатинина, общего белка, глюкозы, триацилглицеролов, аммиака. Исследования проведены на автоматическом биохими-

ческом анализаторе ERBA XL-100 («Erba Group», Чехия). Уровень аргинина определяли методом капиллярного электрофореза на приборе «Капель 105М» («Люмэкс», Россия).

Статистический анализ результатов проводили с использованием программы Statistica 10 («StatSoft Inc.», США). Различия между средними значениями были определены с помощью критерия Тьюки при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Исследование биохимического состава сыворотки крови в возрасте 30 сут по завершении применения препарата показало, что испытуемый препарат не оказывает негативного влияния на метаболические процессы и общее состояние организма поросят. Практически все исследуемые биохимические показатели крови находились в пределах физиологической нормы, но было зафиксировано статистически значимое различие групповых данных по концентрации в крови аммиака и аргинина (табл. 1).

Снижение концентрации аммиака в крови у поросят опытной группы является показателем активации фермента CPS1 (без NCG данный фермент находится в неактивной

Таблица 1. Показатели биохимического состава крови поросят-сосунов по завершению исследования ($M \pm m$; $n = 15$)

Table 1. Biochemical blood parameters of suckling piglets at the end of the study ($M \pm m$; $n = 15$)

Показатели	Группы	
	опыт	контроль
Общий белок, ммоль/л	81,40±9,59	80,60±10,26
Альбумины, ммоль/л	46,60±4,87	43,08±4,02
Глюкоза, ммоль/л	4,8±1,33	4,6±1,4
Триглицеролы, мМ	1,33±0,14*	1,05±0,16
Мочевина, ммоль/л	5,46±0,45	6,25±0,69
Аммиак, мкмоль/л	19,12±2,98*	53,66±7,60
Аргинин, мкмоль/л	20,72±0,71*	14,30±1,82
Креатинин, мкмоль/л	418,4±23,4*	355,8±36,3

Примечание: * — $p < 0,05$ по *t*-критерию при сравнении с контролем.

Note: * — $p < 0.05$ by *t*-test when compared with the control.

Таблица 2. Живая масса поросят и среднесуточный прирост живой массы ($M \pm m$; $n=12$)
Table 2. Live weight of piglets and average daily live weight gain ($M \pm m$; $n=12$)

Группы	Показатели роста			
	Живая масса до исследования, кг	Живая масса на 30-й день исследования, кг	Прирост за период исследования	Среднесуточный прирост за период исследования, г/сут.
Опыт	0,54±0,18	3,77±0,37*	3,23±0,01*	108±6*
Контроль	0,56±0,29	2,85±0,43	2,29±0,02	76±14

Примечание: * — $p < 0,05$ по t -критерию при сравнении с контролем.

Note: * — $p < 0.05$ by t -test when compared with the control.

форме), восстановления активности орнитинового цикла, повышения активности белоксинтезирующей системы.

Основываясь на данных показателях, полученных в эксперименте, можно утверждать, что применение N-карбамоилглутамата (NCG) активизирует карбамоилфосфатсинтетазу, что приводит к повышению продукции карбамоилфосфата, который, помимо активизации мочевинообразования и продукции аргинина, участвует и в синтезе креатина, фосфорилированная форма которого обладает высоким запасом свободной энергии.

Данные показатели свидетельствуют, что карбамоилфосфат способствует не только удалению конечного токсичного продукта метаболизма азотосодержащих веществ аммиака, но в определённых метаболических ситуациях он будет направлен на синтез высокоэнергетического вещества креатинфосфата с использованием его в процессах синтеза, а именно обеспечение их энергией. Наиболее активно этот процесс протекает в скелетных мышцах. В связи с этим можно говорить о повышении фосфорилированной формы креатина, как активирующем процессе снижения аммиака не только через мочевинообразование, но и по пути синтеза белоксодержащих веществ, что подтверждается достоверным увеличением концентрации креатинина в крови у поросят опытных групп относительно поросят контрольной группы на 17,6%. Активация орнитинового цикла на уровне карбамоилфосфата способствует существенному снижению уровня аммиака, т. е. лучшей утилизации азота корма.

Повышение концентрации аргинина в опытной группе указывает на активизацию продукции эндогенного аргинина и тем самым — на лучшее обеспечение белкового синтеза этой незаменимой аминокислотой, а также на снижение затрат энергии на мочевинообразование при нейтрализации аммиака.

Определённая часть продукции мочевины была обусловлена связыванием аммиака, поэтому сэкономленная метаболическая энергия в условиях опыта была использована для синтеза белка, что подтверждается достоверным повышением прироста у поросят опытных групп на 32,8% по сравнению с контролем. В опытной группе также достоверно за период исследования повысился среднесуточный прирост на 42%. Данные приведены в табл. 2.

Применение препарата карбамоилглутамата способствует увеличению эндогенной продукции аргинина, нейтрализации аммиака, образующегося в метаболических процессах, а также экономии затрат метаболической энергии на связывание аммиака в цикле мочевинообразования и способствует интенсификации набора живой массы тела у поросят-сосунов.

Заключение

В ходе проведённых исследований было установлено значительное достоверное снижение аммиака в плазме крови поросят опытной группы, что свидетельствует не только о снижении его синтеза, но и о повышенном его использовании как источника небелкового азота, что подтверждается

достоверным повышением концентрации аргинина и креатинина в крови поросят опытных групп относительно контроля и достоверным увеличением приростов живой массы у поросят опытной группы. Применение препарата карбамоилфосфата у поросят способствует активизации орни-

тинового цикла, увеличению эндогенной продукции незаменимой аминокислоты аргинина, нейтрализации аммиака, образующегося в метаболических процессах, а также экономии затрат метаболической энергии на связывание аммиака в цикле мочевинообразования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Ah Mew N., Caldovic L. N-acetylglutamate synthase deficiency: An insight into the genetics, epidemiology, pathophysiology, and treatment. *Appl. Clin. Genet.* 2011;4:127–135. DOI: 10.2147/TACG.S12702
2. Ah Mew N., Payan I., Daikhin Y. Effects of a single dose of N-carbamylglutamate on the rate of ureagenesis. *Mol. Genet. Metab.* 2009;98(4):325–330. DOI: 10.1016/j.ymgme.2009.07.010
3. Bachmann C., Brandis M., Weissenbarth-Riedel E., Burghard R., Colombo J.P. N-acetylglutamate synthetase deficiency, a second patient. *J. Inherit. Metab. Dis.* 1988;11(2):191–193. DOI: 10.1007/BF01799871
4. Bachmann C., Krähenbühl S., Colombo J.P., Schubiger G., Jaggi K.H., Tönz O. N-acetylglutamate synthetase deficiency: A disorder of ammonia detoxication. First report of NAGS deficiency patient. *N. Engl. J. Med.* 1981;304(9):543. DOI: 10.1056/NEJM198102263040918
5. Brusilow S.W., Horwich A.L. Urea cycle enzymes. In: Valle D.L., Antonarakis S., Ballabio A., Beaudet A.L., Mitchell G.A. (eds). *The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. McGraw-Hill Education, 2019. DOI: 10.1036/ommbid.395
6. Cartagena A., Prasad A.N., Rupar C.A., Strong M., Tuchman M., Ah Mew N., Prasad C. Recurrent encephalopathy: NAGS (N-acetylglutamate synthase) deficiency in adults. *Can. J. Neurol. Sci.* 2013;40(1):3–9. DOI: 10.1017/s0317167100012877
7. Daniotti M., La Marca G., Fiorini P., Filippi L. New developments in the treatment of hyperammonemia: Emerging use of carginic acid. *Int. J. Gen. Med.* 2011;4:21–28. DOI: 10.2147/IJGM.S10490
8. de Cima S., Polo L.M., Díez-Fernández C., Martínez A.I., Cervera J., Fita I., Rubio V. Structure of human carbamoyl phosphate synthetase: Deciphering the on/off switch of human ureagenesis. *Sci. Rep.* 2015;5:16950. DOI: 10.1038/srep16950
9. Häberle J., Schmidt E., Pauli S., Kreuder J.G., Plecko B., Galler A., Wermuth B., Harms E., Koch H.G. Mutation analysis in patients with N-acetylglutamate synthase deficiency. *Hum. Mutat.* 2003;21(6):593–597. DOI: 10.1002/humu.10216
10. Häberle J. Role of carginic acid in the treatment of acute hyperammonemia due to N-acetylglutamate synthase deficiency. *Ther. Clin. Risk Manag.* 2011;7:327–332. DOI: 10.2147/TCRM.S12703
11. Matoori S., Leroux J.C. Recent advances in the treatment of hyperammonemia. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2015;90:55–68. DOI: 10.1016/j.addr.2015.04.009
12. Oishi K., Diaz G.A. Glycerol phenylbutyrate for the chronic management of urea cycle disorders. *Expert Rev. Endocrinol. Metab.* 2014;9(5):427–434. DOI: 10.1586/17446651.2014.945908
13. Sancho-Vaello E., Marco-Marin C., Gougeard N., Fernández-Murga L., Rüfenacht V., Mustedanagic M., Rubio V., Häberle J. Understanding N-acetyl-L-glutamate synthase deficiency: Mutational spectrum, impact of clinical mutations on enzyme functionality, and structural considerations. Most recent comprehensive report of clinical mutation in patients with NAGS deficiency. *Hum. Mutat.* 2016;37(7):679–694. DOI: 10.1002/humu.22995
14. Tuchman M., Caldovic L., Daikhin Y., Horyn O., Nissim I., Nissim I., Korson M., Burton B., Yudkoff M. N-carbamylglutamate markedly enhances ureagenesis in N-acetylglutamate deficiency and propionic acidemia as measured by isotopic incorporation and blood biomarkers. *Pediatr Res.* 2008;64(2):213–217. DOI: 10.1203/PDR.0b013e318179454b

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРЕ | INFORMATION ABOUT THE AUTHOR

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

Konstantin S. Ostrenko, Dr. 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: Ostrenkoks@gmail.com



СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИМПУЛЬСНОГО И НЕПРЕРЫВНОГО 450 НМ ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА ТКАНИ ДЛЯ ПОСЛОЙНОГО УДАЛЕНИЯ ПИГМЕНТНЫХ НЕВУСОВ

С.А. Подурар¹, Н.Е. Горбатова^{1,*}, А.В. Брянцев¹, Н.В. Станкова²,
А.С. Тертычный³, Г.А. Варев⁴

¹ ГБУЗ «Научно-исследовательский институт неотложной детской хирургии и травматологии» ДЗМ
119180, Российская Федерация, Москва, ул. Большая Полянка, 22

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

³ ФGAOY BO «Первый Московский государственный медицинский университет
имени И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет)
119991, Российская Федерация, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

⁴ ООО «Русский инженерный клуб»
300053, Российская Федерация, Тульская обл., Тула, ул. Вильямса, 8

Пигментные доброкачественные образования кожи, в т. ч. врождённые гигантские пигментные невусы (ВГПН) — патологические образования кожи, расположенные в различных её слоях, состоящих из скопления клеток-меланоцитов. ВГПН представляют особую психологическую и медицинскую проблему, связанную с обширным неэстетичным изменением кожного облика пациента. В настоящее время существуют многочисленные методы их лечения, в т. ч. с использованием лазерного излучения. Однако они часто неэффективны и приводят к неудовлетворительным клиническим и эстетическим результатам, при этом частота осложнений в виде рубцовой деформации и рецидива иногда достигает 41%. В связи с этим проблема эффективного и корректного лечения данной патологии остаётся актуальной и требует дальнейшего исследования. Целью работы является экспериментальное медико-биологическое исследование особенностей воздействия «синего» лазерного излучения с длиной волны (λ) 450 нм на ткани лабораторных животных для его использования при лечении пигментных невусов, включая ВГПН. В работе использовали «синее» лазерное излучение (λ — 450 нм), генерируемое лазерным аппаратом «Лазермед 10-03» (ООО «Русский инженерный клуб», г. Тула, Россия). Экспериментальное медико-биологическое исследование *in vitro* выполнено на охлаждённых образцах печени и мышцах мини-свиньи и *in vivo* на пигментированной коже живой лабораторной крысы с изучением динамики регенеративного раневого процесса участков воздействия на разные сроки — сразу после воздействия и до 90 сут. Проведена морфометрическая оценка зон воздействия: глубина проникновения, характер коагуляционных изменений. На основании результатов выполненного экспериментального исследования определены оптимальные режимы «синего» лазерного излучения (λ — 450 нм) для прецизионного удаления различных пигментных образований кожи. Лазерное излучение с длиной волны 450 нм является перспективным для эффективного лечения пигментных образований кожи, включая ВГПН.

Ключевые слова: «синее» лазерное излучение с длиной волны (λ) 450 нм, пигментные образования кожи, врождённый гигантский пигментный невус, экспериментальное исследование, морфологическое исследование

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Подурар С.А., Горбатова Н.Е., Брянцев А.В., Станкова Н.В., Тертычный А.С., Варев Г.А. Сравнительное исследование эффективности импульсного и непрерывного 450 нм лазерного излучения на ткани для послойного удаления пигментных невусов. *Биомедицина*. 2024;20(3):100–113. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-3-100-113>

Поступила 03.12.2023

Принята после доработки 13.05.2024

Опубликована 10.09.2024

COMPARATIVE STUDY OF THE EFFECTIVENESS OF PULSED AND CONTINUOUS 450 NM LASER RADIATION ON TISSUE FOR LAYERED REMOVAL OF PIGMENTED NEVI

Stanislav A. Podurar¹, Natalya E. Gorbatova^{1,*}, Alexander V. Bryantsev¹,
Nataliia V. Stankova², Aleksandr S. Tertychnyy³, Gennady A. Varev⁴

¹ *Clinical and Research Institute of Emergency Pediatric Surgery and Trauma
of the Moscow City Health Care Department
119180, Russian Federation, Moscow, Bolshaya Polyanka Str., 22*

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

³ *I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University)
119991, Russian Federation, Moscow, Trubetskaya Str., 8, Build. 2*

⁴ *Russian Engineering Club
300053, Russian Federation, Tula Region, Tula, Villiamsa Str., 8*

Benign pigmented skin lesions, including congenital giant pigmented nevi (CGPN), are pathological formations located in various skin layers and consisting of melanocyte clusters. CGPN represent a serious psychological and medical problem associated with extensive unaesthetic changes in the patient's skin appearance. These lesions are currently treated by various methods, including laser radiation. However, such methods often render ineffective and lead to unsatisfactory clinical and aesthetic results, with the incidence of complications in the form of scarring and recurrence sometimes reaching 41%. Therefore, the problem of effective and appropriate treatment of this pathology is relevant, deserving further research. In this work, we conduct an experimental biomedical study into the effect of blue laser radiation with a wavelength (λ) of 450 nm on the tissues of laboratory animals in order to determine its prospects in the treatment of pigmented nevi, including CGPN. Blue laser radiation (λ — 450 nm) was generated by an Lasermed 10-03 device (Russian Engineering Club, LLC, Tula, Russia). An experimental biomedical in vitro research was performed on chilled samples of the liver and muscles of mini-pigs and in vivo on the pigmented skin of live laboratory rats. The dynamics of the regenerative wound process in the exposure areas was studied at different periods, i.e., immediately after exposure and following up to 90 days. A morphometric assessment of the exposure areas was carried out in terms of penetration depth and coagulation changes. The results obtained allowed determination of optimal parameters of 450 nm blue laser radiation for a precision removal of various pigmented skin formations. Laser radiation with a wavelength of 450 nm is a promising treatment approach for pigmented skin lesions, including CGPN.

Keywords: 450 nm blue laser radiation, pigmented skin formations, congenital giant pigmented nevus, experimental study, morphological study

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

For citation: Podurar S.A., Gorbatova N.E., Bryantsev A.V., Stankova N.V., Tertychnyy A.S., Varev G.A. Comparative Study of the Effectiveness of Pulsed and Continuous 450 nm Laser Radiation on Tissue for Layered Removal of Pigmented Nevi. *Journal Biomed.* 2024;20(3):100–113. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-3-100-113>

Submitted 03.12.2023

Revised 13.05.2024

Published 10.09.2024

Введение

Пигментные невусы (ПН) — это образования кожи, состоящие из клеток-меланоцитов различной локализации и формы. Впервые термин «невус», определяющий пигментные образования кожи, применил в 1863 г. R. Virchow [14]. Врождённые гигантские пигментные невусы (ВГПН) — патологические образования кожи, расположенные в различных её слоях, занимающие обширные участки тела. Пигментные образования кожи имеют нейроэктодермальный генез [9]. ВГПН вызваны генетической мутацией белков NRAS и KRAS [16]. Пигментные невусы классифицируют на простые, редкие и ВГПН [1]. Последние по размеру разделяют на истинно гигантские (>10–60 см), средние (1,5–10 см) и малые (<1,5 см) [13].

По частоте возникновения ВГПН выявляются от 1 на 20000 до 1 на 500000 новорождённых. ВГПН локализуются на разных участках тела: на лице, туловище и конечностях, часто занимают обширные площади. Они оказывают серьёзное психологическое воздействие, вызванное изменением облика человека, и представляют значительную медицинскую и социальную проблему [4, 10]. В течение жизни отмечены этапы их относительно резкого увеличения, чаще в 4 и 7 лет и особенно в период гормональной перестройки (в 76,8% случаев). Возможно возникновение осложнений — в результате травматического повреждения образования одеждой и предметами быта (23,2%), избыточной инсоляции (64,9%), что может привести к фрагментации и десквамации поверхности, воспалению и кровотечению,

а также к малигнизации, чаще у взрослых пациентов (в 10–15% случаев) [18].

В настоящее время удаление ПН осуществляют различными способами: хирургическим иссечением с кожной пластикой, методами криодеструкции и диатермокоагуляции (электрокоагуляции), механической и химической дермабразии и способами с использованием различного лазерного излучения. Вышеуказанные методы лечения имеют существенные недостатки — либо они не всегда применимы, либо недостаточно эффективны и вызывают избыточное термическое воздействие из-за сложности контроля его глубины, что сопровождается значительным повреждением тканей кожи и приводит к различным осложнениям [6]. Неудовлетворительные результаты лечения пигментных образований кожи, включая ВГПН, отмечают у 41% пациентов, с частотой осложнений до 50%, в виде рубцовой деформации кожи и рецидива образования до 6% случаев [17, 19].

Наиболее перспективным для удаления ПН рассматривают использование различного лазерного излучения. Для их лечения применяют пигментно-специфические лазерные аппараты: на рубине (длина волны (λ) — 694 нм), александрите (λ — 755 нм), иттрий-алюминий-гранате Nd:YAG (λ — 1064 нм); абляционные лазеры: эрбиевый Er:YAG (λ — 2940 нм); а также некоторые режимы коротко импульсного лазерного излучения, например CO₂-лазеров (λ — 10,6 нм). Однако при использовании данных лазеров в 2–5% случаев отмечается образование гипертрофических и келоидных рубцов [8, 12]. После лечения способом

«лазерной» дермабразии, в зависимости от ее глубины, возможно возникновение до 21% случаев глубокой дермабразии, гиперпигментации — у 13% пациентов и избыточной гипопигментации — до 34% случаев [3]

Стоит отметить, что проблема лечения различных форм ПН остаётся актуальной, и это требует поиска новых высокоэффективных методов лечения на основе использования феномена селективности лазерного излучения к хромофорам кожи, что обеспечит избирательное удаление тканей пигментных образований при минимальном повреждении подлежащих тканевых структур. В последнее время в литературе появились немногочисленные публикации по использованию лазерного излучения «синего» спектрального диапазона с длиной волны 450 нм, имеющего почти одинаковый высокий пик поглощения меланином, гемоглобином и, в меньшей степени, водой (рис. 1). Глубина проникнове-

ния «синего» лазерного излучения с длиной волны 450 нм в тканях кожи относительно не глубокая, в пределах эпидермиса и верхних слоёв дермы, до 450 нм (рис. 2).

На сегодняшний день исследования по воздействию лазерного излучения с длиной волны 450 нм немногочисленны и проводились лишь в экспериментах на сосудистых тканях куриных эмбрионов [15]. В связи с этим проблема использования данного лазерного излучения для удаления пигментных образований кожи, включая ВГПН, остаётся нерешённой.

Целью работы является экспериментальное медико-биологическое исследование особенностей воздействия «синего» (λ — 450 нм) лазерного излучения на ткани лабораторных животных для последующего его использования при лечении пигментных образований кожи, включая ВГПН.

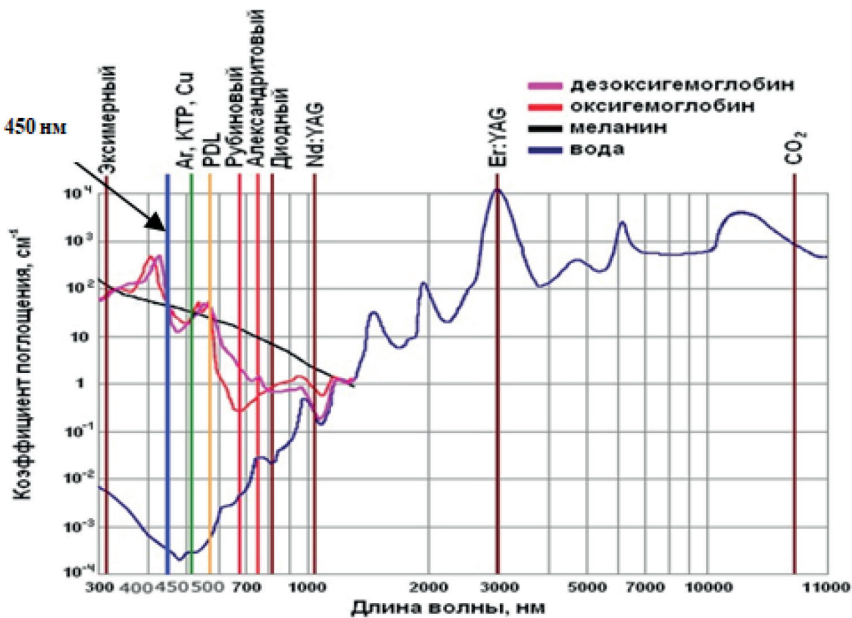


Рис. 1. Спектры поглощения лазерного излучения хромофорами кожи [7].
Fig. 1. Absorption spectra of laser radiation by skin chromophores [7].

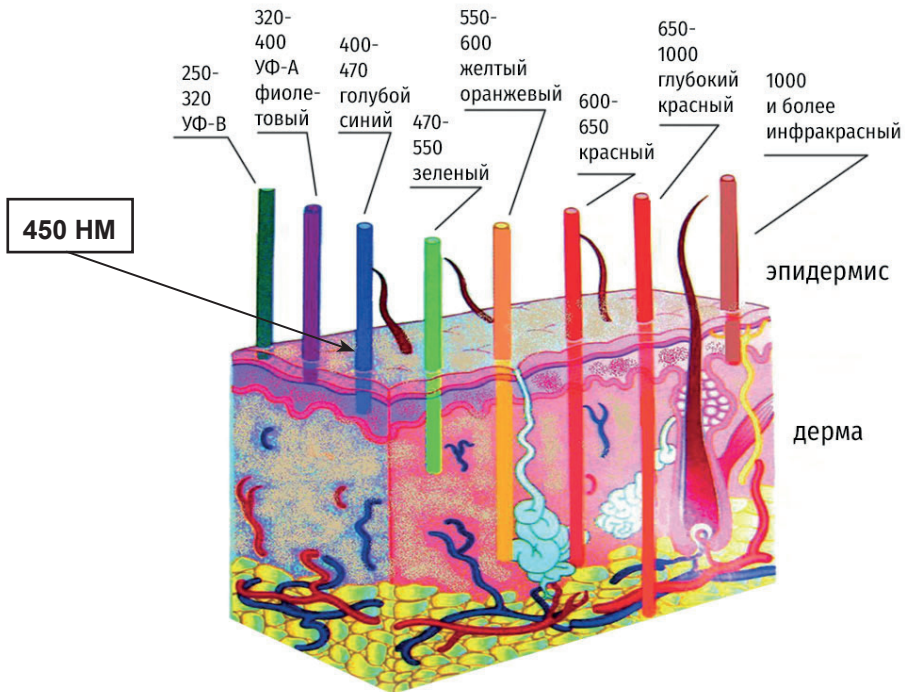


Рис. 2. Глубина проникновения лазерного излучения [7].
Fig. 2. Penetration depth of laser radiation [7].

Материалы и методы

В работе использовано лазерное излучение «синего» спектрального диапазона (λ — 450 нм, с мощностью до 10 Вт и диаметром пятна 0,6–1,5 мм), генерируемое в непрерывном и импульсном режиме диодным лазерным аппаратом «Лазермед 10-03», разработанным для медицинских целей в ООО «Русский инженерный клуб» (Россия). Аппарат и регистрационное удостоверение № РЗН 2014/2111 на медицинское изделие представлены на рис. 3 и 4 соответственно.

Экспериментальное медико-биологическое исследование включало два раздела: *in vitro* и *in vivo*. В качестве объектов медико-экспериментального исследования было выбрано три модельных объекта — печень и мышцы мини-свиней светлогорской породы (*Sus salvanius*), а также кожа ла-

бораторных крыс с тёмными чёрно-серыми пятнами. Известно, что ткани органов мини-свиней имеют наибольшее сходство по анатомическому строению и физиологии с человеком [5]. Печень мини-свиней является оптимальным объектом для изучения результатов воздействия лазерного излучения на содержащие гемоглобин ткани. Она имеет относительно однородную тканевую структуру с преобладающим содержанием гемоглобина по сравнению с другими тканями, в частности мышечной, которая была выбрана для сравнения [2].

В эксперименте *in vitro* задействовано две мини-свиньи, которым выполнен забор 6 образцов охлаждённых препаратов печени и 6 образцов мышечной ткани, проведено исследование 12 макроскопических препаратов с зонами воздействия и 72 соответствующих гистологических препаратов.



Рис. 3. Лазерный аппарат «Лазермед 10-03».
Fig. 3. Lasermed 10-03 laser device.



Рис. 4. Регистрационное удостоверение на медицинское изделие.

Fig. 4. Registration certificate for the laser device.

В эксперименте *in vivo* в качестве биологической модели пигментных образований было задействовано 14 лабораторных крыс в возрасте 6–8 мес. Для исследования непрерывного режима использовано 7 лабораторных крыс, выполнена 21 кожная проба с анализом макроскопических изменений и исследовано 126 соответствующих гистологических препаратов. Изучение импульсного режима было проведено на 7 лабораторных крысах. Выполнены 63 кожные пробы и исследованы макроскопические изменения в этих зонах, а также проведён анализ 378 соответствующих гистологических препаратов.

Образцы биотканей с зонами воздействия лазерным излучением (λ — 450 нм) для гистологического исследования фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине. Исследование проводили в автоматическом режиме аппарата фирмы «Excelsior» («Termo Scientific», Великобритания), за-

ливали в парафин на аппарате «ЕС350» («Microm», Германия). С парафиновых блоков получали срезы толщиной 2–3 мкм на микротоме «HM355S» с системой переноса срезов STS («Termo Scientific», Великобритания). Гистопрепараты депарафинировали и выполняли окраску гематоксилином и эозином. Гистологические препараты просматривали в микроскопе «CX41» («Olympus», Япония). Микрофотографии гистологических препаратов получали сканированием на микроскопе «Pannoramic Midi» («3DHISTECH», Венгрия), и при различном увеличении изучали полноценное изображение с анализом и интерпретацией результатов морфометрических параметров участков повреждённых тканей.

Исследование одобрено локальным этическим комитетом при ГБУЗ «НИИ «Неотложной детской хирургии и травматологии» ДЗМ.

**Методика выполнения
экспериментального исследования *in vitro***

На охлаждённые образцы печени через её капсулу и на мышцы воздействовали в импульсном и непрерывном режиме единичными импульсами с неподвижным лазерным пятном излучением с длиной волны 450 нм.

В непрерывном режиме использовали режимы мощности излучения 1, 3, 6 и 10 Вт; экспозиция была постоянная — 1 с, диаметр лазерного пятна на поверхности объекта — 1,0 мм.

В импульсном режиме на образцы воздействовали излучением с лазерным пятном диаметром 1,0 мм на поверхности объекта. Переменные параметры лазерного излучения были следующими: мощность — 1, 3, 6 и 10 Вт, длительность импульса — 0,5 с, расстояние между импульсами — 0,5 с.

**Методика выполнения
экспериментального исследования *in vivo***

Анестезиологическое пособие. Предварительно лабораторную крысу взвешивали, затем вводили анестезиологический препарат в соответствии с инструкцией. Эксперименты проведены под общим обезболиванием: анестезиологическое пособие — препарат «Золетил» из расчёта 0,1 мл на 100 мг массы тела лабораторного

животного путём внутримышечного введения. В области спины проводили эпиляцию кожного покрова с помощью электробритвы («Moser», Германия) насадкой под 0, затем кожу спины обрабатывали неспиртовыми анти-септическими растворами (хлоргексидин).

**Технические аспекты выполнения
экспериментального исследования**

На кожу воздействовали лазерным излучением (λ — 450 нм) с постоянными параметрами диаметра лазерного пятна 1,0 мм и с постоянной скоростью однократного сканирования 0,5 см/с по поверхности зоны объекта.

В непрерывном режиме лазерного излучения использовали переменные параметры мощности: 3, 6 и 10 Вт. Параметры режимов непрерывного лазерного излучения (λ — 450 нм), использованные в эксперименте *in vivo*, представлены в табл. 1. Соответствующие им зоны воздействия на коже спины лабораторных крыс обозначены стрелками с нумерацией режимов и представлены на рис. 5.

В импульсном режиме лазерного излучения (λ — 450 нм) с постоянной длительностью импульса 0,5 с использовали следующие переменные параметры: расстояние между импульсами — 0,5; 0,25 и 0,1 с; мощность — 3, 6 и 10 Вт. Параметры режимов импульсного лазерного излучения (λ — 450 нм), использованные в эксперименте, представлены в табл. 2. Соответствующие им зоны воздействия на коже спины лабораторных крыс обозначены стрелками с нумерацией режимов и представлены на рис. 6.

Забор экспериментального материала для гистологического исследования осуществляли сразу после воздействия

Таблица 1. Режимы непрерывного излучения
Table 1. Parameters of continuous mode

№ режима	Мощность, Вт
1	3
2	6
3	10

Таблица 2. Режимы импульсного излучения
Table 2. Parameters of pulse mode

№ режима	Мощность, Вт	Время между импульсами, с
1–3	3	0,5; 0,25; 0,1
4–6	6	0,5; 0,25; 0,1
7–9	10	0,5; 0,25; 0,1

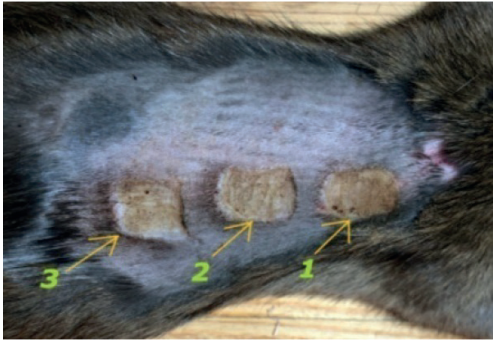


Рис. 5. Зоны воздействия при непрерывном режиме (0-й срок).
Fig. 5. Continuous exposure zones (0 duration).

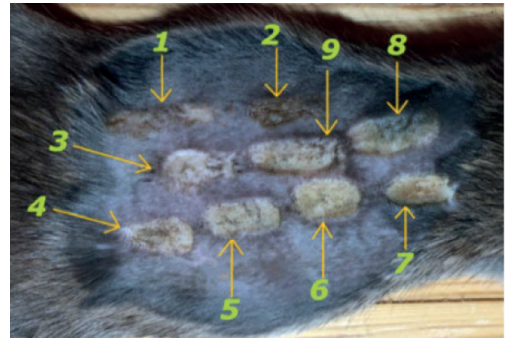


Рис. 6. Зоны воздействия при импульсном режиме (0-й срок).
Fig. 6. Exposure zones in pulse mode (0 duration).

(нулевой срок) и далее на 4-е, 7-е, 12-е, 21-е, 30-е и 90-е сут. В указанные сроки проводили забор биологического материала кожи методом хирургического иссечения под общим обезболиванием препаратом «Золетил». После забора материала лабораторное животное выводили из эксперимента гуманной эвтаназией путём увеличения дозы препарата, согласно руководству «Федерации европейских научных ассоциаций по лабораторным животным» (Federation of European Laboratory Animals Science Associations, FELASA).

Результаты исследований

Макроскопическое исследование образцов печени

Исследование определило, что при всех использованных параметрах лазерного излучения присутствуют округлые дефекты с коагуляционным венчиком вокруг, коричнево-жёлтого цвета; при использовании импульсного режима их диаметр значительно меньше — 0,3–1,5 мм, при непрерывном режиме он увеличивается до 0,5–2,0 мм (рис. 7).

Результаты гистоморфологического исследования ткани печени

Лазерное излучение (λ – 450 нм) в непрерывном режиме в точечных зонах оказывает выраженное термическое повреждение

на ткань печени. При этом отмечено наличие всех участков деструктивных и распространённых повреждений, характерных для лазерного излучения: их ширина на поверхности — до $1150,0 \pm 250,0$ мкм, глубина — до $230,0 \pm 100,0$ мкм. При использовании параметров мощности до 10,0 Вт образуется и значительного размера минусовой дефект – кратер (рис. 8 а, б).

В импульсном режиме лазерное излучение (λ — 450 нм) формирует термическое повреждение в виде широких (до $1350,0 \pm 150,0$ мкм) деструктивных изменений, представленных на поверхности тонким слоем ($45,0 \pm 5,0$ мкм) компактного коагуляционного некроза, под которым присутствует слой гомогенизированной ткани, — до $200,0 \pm 50$ мкм (рис. 8 в, г).

Макроскопическое исследование образцов мышц

При всех использованных параметрах непрерывного режима (кроме мощности 1,0 Вт, при которой изменения не выявлены) было отмечено образование округлой формы, слегка заглаблённой поверхности бело-жёлтого цвета, размеры которой увеличиваются от 0,5 до 2,5 мм с нарастанием мощности. В центре зоны воздействия при 6,0 Вт присутствовал более тёмного цвета, точечный, минусовой дефект до 0,2 мм, более выраженный при 10,0 Вт (рис. 9 а, б).



Рис. 7. Воздействие на охлаждённые образцы печени свиньи в непрерывном (а — 6 Вт, б — 10 Вт) и в импульсном режиме (в — 6 Вт, з — 10 Вт).

Fig. 7. Exposure of chilled pig liver samples in continuous (a — 6 W, б — 10 W) and pulsed modes (в — 6 W, з — 10 W).

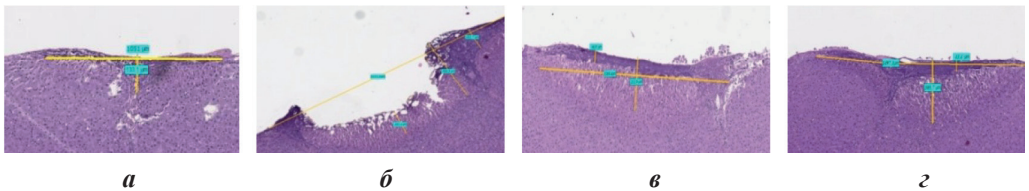


Рис. 8. Воздействие на охлаждённые образцы печени свиньи в непрерывном (а — 6 Вт, б — 10 Вт) и в импульсном режиме (в — 6 Вт, з — 10 Вт).

Fig. 8. Exposure of chilled pig liver samples in continuous (a — 6 W, б — 10 W) and pulsed modes (в — 6 W, з — 10 W).

В импульсном режиме при мощности 1,0 Вт изменения не отмечены, в случае использования мощности 3,0 Вт определён незначительный эффект воздействия в виде слегка беловатой поверхности диаметром не более 0,5 мм. При использовании мощности 6,0 и 10,0 Вт отмечено наличие поверхностных округлых беловато-жёлтого цвета дефектов, диаметром 1,0 и 2,0 мм соответственно, минус-ткань в центре не определяется (рис. 9 в, г).

Гистоморфологическое исследование воздействия на мышечную ткань

При использовании непрерывного режима (λ — 450 нм) отмечен выраженный термический эффект, который носит поверхностный характер в виде тонкого слоя компактного коагуляционного некроза, средней глубиной до $250,0 \pm 120,0$ мкм, без повреждения подлежащих миоцитов (рис. 10 а, б).

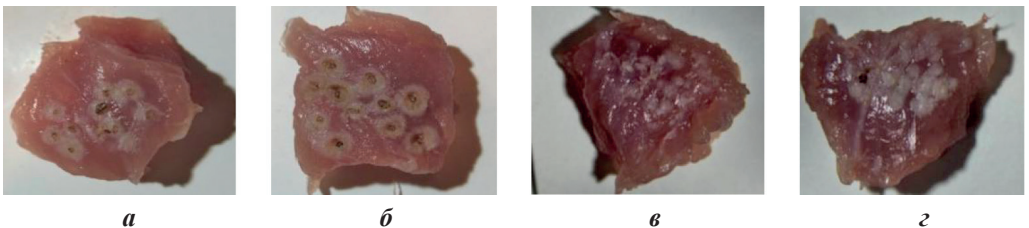


Рис. 9. Воздействие на охлаждённые образцы мышц свиньи в непрерывном (а — 6 Вт, б — 10 Вт) и в импульсном режиме (в — 6 Вт, з — 10 Вт).

Fig. 9. Exposure of chilled pig muscle samples in continuous (a — 6 W, б — 10 W) and pulsed modes (в — 6 W, з — 10 W).

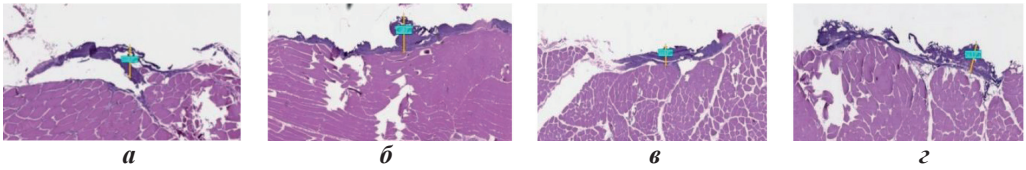


Рис. 10. Воздействие на охлаждённые образцы мышц свиньи в непрерывном (а — 6 Вт, б — 10 Вт) и в импульсном режиме (в — 6 Вт, г — 10 Вт).
Fig. 10. Exposure of chilled pig muscle samples in continuous (a — 6 W, б — 10 W) and pulsed modes (в — 6 W, г — 10 W).

В импульсном режиме использование лазерного излучения (λ — 450 нм) термическое повреждение выявлено только при увеличении мощности до 6,0 Вт в виде тонкого слоя компактного коагуляционного некроза на поверхности, средней глубиной $190,0 \pm 20,0$ мкм (рис. 10 в, г).

Таким образом, при всех обозначенных параметрах отмечен схожий, стабильно неглубокий характер повреждения мышечной ткани, в случае импульсного режима — более поверхностный по сравнению с непрерывным режимом; при сравнении с воздействием на ткань печени изменения носят значительно менее выраженный характер. Экспериментально определено, что для дальнейшего исследования целесообразным является использование длительности импульса 0,5 с и времени между импульсами 0,25 с.

Результаты воздействия in vivo на 0-й сроке (сразу) и до 90-х сут

Визуально сразу после воздействия излучения определяется светлый ровный участок поверхности, выполненной бе-

ловато-жёлтой коагуляционной корочкой. При использовании большей энергетической активности и непрерывном режиме излучения данная послеоперационная корочка более плотная и интенсивнее окрашена в жёлто-коричневый цвет, с 12-х сут отмечено её частичное отторжение с краёв, причём при использовании непрерывного режима она сохраняется дольше (до 21-х сут), полное отторжение которой при всех режимах определяется на 30-е сут. Эпителизация раневой поверхности отчётливо определяется с 21-х сут, на 30-е сут все зоны воздействия представлены светлой кожей без пигментации, которая присутствует и на 90-е сут. Воспалительные проявления на всех сроках наблюдения отсутствуют.

Примеры макроскопических изменений использования непрерывного и импульсного режима лазерного излучения (λ — 450 нм) представлены на рис. 11 и 12.

Гистологическая картина в зонах воздействия

На 0-й срок при непрерывном и импульсном режиме определяется с поверхности



Рис. 11. Воздействие на кожу спины лабораторной крысы на 0-м сроке в непрерывном режиме.
Fig. 11. Exposure to the skin of the back of a laboratory rat for 0 days in continuous mode.

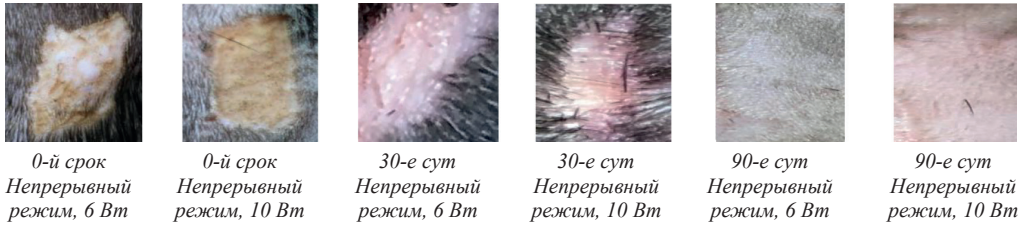


Рис. 12. Воздействие на кожу спины лабораторной крысы на 30-е сут в импульсном режиме.
Fig. 12. Exposure to the skin of the back of a laboratory rat for 30 days in pulsed mode.

участок коагуляционного гомогенного некроза, средней толщиной $550,0 \pm 250,0$ и $275,0 \pm 125,0$ мкм соответственно, далее переход в неизменённую ткань. Придатки кожи с коагуляционными изменениями сохраняются частично в зоне некроза, карбонизации нет (рис. 13, 1–4).

На 21-е сут при непрерывном и импульсном режиме зона воздействия представлена восстановившимся эпителием с придатками, средняя его толщина, соответственно, — $500,0 \pm 200,0$ и $350,0 \pm 100,0$ мкм. Под ним наблюдается зона коллагеновых волокон,

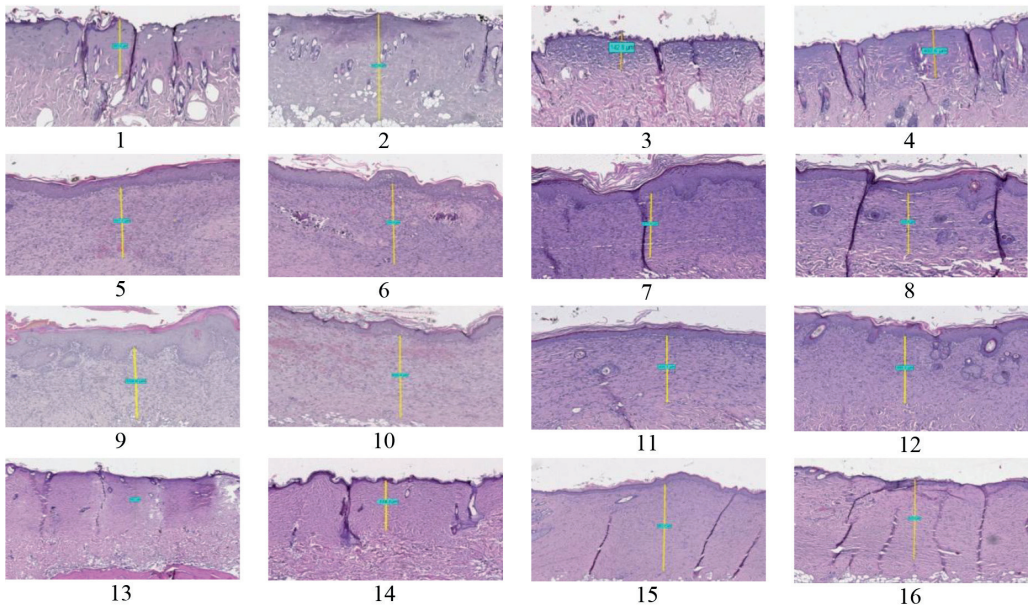


Рис. 13. Воздействие на кожу спины живой лабораторной крысы: на 0-м сроке в непрерывном режиме: 1–6 Вт, 2–10 Вт; в импульсном режиме: 3–6 Вт, 4–10 Вт; на 21-е сут в непрерывном режиме: 5–6 Вт, 6–6 Вт; в импульсном режиме: 7–6 Вт, 8–10 Вт; на 30-е сут в непрерывном режиме: 9–6 Вт, 10–10 Вт; в импульсном режиме: 11–6 Вт, 12–10 Вт; на 90-е сут в непрерывном режиме: 13–6 Вт, 14–10 Вт; в импульсном режиме: 15–6 Вт, 16–10 Вт.

Fig. 13. Exposure on the skin of the back of a live laboratory rat: for 0 days in continuous mode: 1–6 W, 2–10 W; pulse mode: 3–6 W, 4–10 W; for 21 days in continuous mode: 5–6 W, 6–6 W; pulse mode: 7–6 W, 8–10 W; for 30 days in continuous mode: 9–6 W, 10–10 W; pulse mode: 11–6 W, 12–10 W; for 90 days in continuous mode: 13–6 W, 14–10 W; pulse mode: 15–6 W, 16–10 W.

организующихся параллельно поверхности (рис. 13, 5–8).

На 30-е сут при использовании непрерывного и импульсного режима структура кожи восстановлена полностью, включая придатки. Отмечается более выраженный гиперкератоз и акантоз — в случае непрерывного режима. Под эпителием относительно широкий слой коллагеновых волокон, правильно организованных параллельно поверхности, толщиной $600,0 \pm 50,0$ и $450,0 \pm 50,0$ мкм (рис. 13, 9–12).

На 90-е сут при использовании непрерывного и импульсного режима зона воздействия выполнена восстановившимся эпидермисом, под ним слой параллельно расположенных коллагеновых волокон, толщина его от $500,0 \pm 150,0$ до $800,0 \pm 50,0$ мкм (рис. 13).

В результате экспериментального исследования *in vitro* отмечено следующее:

- лазерное излучение с длиной волны 450 нм оказывает прогнозируемое, относительно неглубоко термическое повреждение биологических тканей, более выраженное на ткани печени по сравнению с мышечной тканью, глубиной от 200 до 450 мкм, увеличивающееся с возрастанием мощности;

- при повреждении ткани печени образуются все участки изменений, характерные для лазерного воздействия, менее выраженные при импульсном режиме и более значительные — при непрерывном, особенно с мощностью 10,0 Вт.

На основании исследования *in vivo* отмечено следующее:

- минимальные термические повреждения эпителия определяются при мощности 3,0 Вт, значительно более выраженные изменения возникают при мощности 6,0 и 10,0 Вт, в виде участка коагуляционного некроза с частичным сохранением проксимальных участков придатков кожи;

- глубина термического повреждения незначительно увеличивается с возрастанием мощности, в среднем составляет 425 нм,

в процессе наблюдения глубина повреждения не нарастает;

- полное восстановление эпителиальных структур при мощности 3,0 Вт отмечено к 12-м сут, при мощности 6,0 и 10 Вт — частично к 21-м сут и полное на 30-е сут, которое сохраняется и на 90-е сут;

- воспалительный раневой процесс носит асептический характер, свойственный лазерным ранам, и сравним с соответствующими физиологическими сроками.

Обсуждение результатов

Воздействие на пигментированные ткани осуществляли «синим» лазерным излучением с длиной волны 450 нм, имеющим высокий коэффициент селективного поглощения меланином и гемоглобином, в меньшей степени — водой. Этот феномен обеспечивает послойное и прогнозируемое удаление тканей пигментных образований с сохранением проксимальных участков придатков кожи, что обеспечивает центральную эпителизацию, возможность удаления относительно больших по площади образований, а также заживление раневой поверхности в кратчайшие сроки при минимальном повреждении подлежащих тканей. В экспериментальном исследовании определены необходимые параметры лазерного излучения (λ — 450 нм), применение которых может быть перспективно при дальнейшем использовании в клиническом исследовании для послойного удаления пигментных тканевых структур кожи.

Заключение

Экспериментально определены перспективные режимы «синего» лазерного излучения с длиной волны 450 нм: мощность — 3,0 и 6,0 Вт, длительность импульса — 0,5 с, время между импульсами — 0,25 с, для послойного удаления пигментных невусов, включая ВГПН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Вулф К. *Дерматология по Томасу Фицпатрику (атлас-справочник)*. Изд. 2-е. М.: Практика, 2007:1248. [Vulf K. *Dermatologiya po Tomasu Fitzpatricku (atlas-spravochnik)* [Dermatology by Thomas Fitzpatrick (atlas-handbook)]. Second edition. Moscow: Praktika Publ., 2007:1248. (in Russian)].
2. Горбатова Н.Е., Золотов С.А., Симановский Я.О., Никифоров С.М., Голубев С.В., Алимпиев С.С., Гейниц А.В., Елисеенко В.И., Станкова Н.В. Экспериментальная сравнительная оценка эффективности режимов абляции различной длительности импульсами CO₂ лазеров на кожных покровах мини-свиней для целей лазерной дермabrasии. *Биомедицина*. 2013;4:90–106. [Gorbatova N.E., Zolotov S.A., Simanovsky Ya.O., Nikiforov S.M., Golubev S.V., Alimpiyev S.S., Geynits A.V., Eliseenko V.I., Stankova N.V. Eksperimental'naya sravnitel'naya otsenka effektivnosti rezhimov ablyatsii razlichnoy dlitel'nosti impul'sami CO₂ lazerov na kozhnykh pokrovakh mini-sviney dlya tseyel lazernoy dermabrazii [Experimental assessment of efficiency of modes of an ablation impulses of CO₂ of lasers of various duration of integuments of mini-pigs for a laser dermabrasiya]. *Biomeditsina* [Journal Biomed]. 2013;4:90–106. (In Russian)].
3. Доронин В.А. *Дермabrasия CO₂-лазером эпидермально-дермальных дефектов, а также увядающей кожи в амбулаторных условиях*: дис. ... канд. мед. наук. М., 2004:92. [Doronin V.A. *Dermabrasiya CO₂-lazerom epidermal'no-dermal'nykh defektov, a takzhe uvayadayushchey kozhi v ambulatornykh usloviyakh*: dis. ... kand. med. nauk [CO₂ laser dermabrasion of epidermal-dermal defects and aging skin in an outpatient setting: Cand. Sci. (Med.) Thesis]. Moscow, 2004:92. (In Russian)].
4. Дорошенко М.Б., Утяшев И.А., Демидов Л.В., Алиев М.Д. Клинические и биологические особенности гигантских врождённых невусов у детей. *Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского*. 2016;95(4):50–56. [Doroshenko M.B., Utyashev I.A., Demidov L.V., Aliev M.D. Klinicheskie i biologicheskie osobennosti gigantskikh vrozhdennykh nevusov u detey [Clinical and biological features of giant congenital nevi in children]. *Pediatrics. Zhurnal im. G.N. Speranskogo* [Pediatrics. Journal named after G.N. Speransky]. 2016;95(4):50–56. (In Russian)].
5. Капанадзе Г.Д., Ашуев Ж.А. Светлогорская популяция мини свиней. *Биомедицина*. 2007;6:71–81. [Kapanadze G.D., Ashuev Zh.A. Svetlogorskaya populyatsiya mini sviney [Svetlogorsk population of mini pigs]. *Biomeditsina* [Journal Biomed]. 2007;6:71–81. (In Russian)].
6. Капустина О.Г. *Диагностика и оптимизация лечения новообразований кожи в амбулаторной практике дерматолога*: дис. ... канд. мед. наук. М., 2009:177. [Kapustina O.G. *Diagnostika i optimizatsiya lecheniya novoobrazovaniy kozhi v ambulatornoj praktike dermatologa*: dis. ... kand. med. nauk [Diagnostics and optimization of treatment of skin neoplasms in outpatient practice of a dermatologist: Cand. Sci. (Med.) Thesis]. Moscow, 2009:177. (In Russian)].
7. Скомаровский В.С., Дорофеева Т.Г. Технологии на основе световых, радиочастотных и плазменных воздействий в эстетической медицине. *Альманах клинической медицины*. 2008;17(2):184–185. [Skomarovskiy V.S., Dorofeeva T.G. Tekhnologii na основе svetovyykh, radiochastotnykh i plazmennyykh vozdeystviy v esteticheskoy meditsine. *Almanac of Clinical Medicine*. 2008;17(2):184–185. (In Russian)].
8. Цховребова Л.Э. Врождённые гигантские пигментные невусы у детей: клиника, диагностика, лечение. *Детская хирургия*. 2014;18(1):38–41. [Tskhovrebova L.E. Vrozhdennyye gigantskiye pigmentnye nevusy u detey: klinika, diagnostika, lechenie [Congenital giant pigmented nevi in children: Clinical features, diagnostics, treatment]. *Detskaya khirurgiya* [Journal of Pediatric Surgery]. 2014;18(1):38–41. (In Russian)].
9. Червоная Л.В. *Пигментные новообразования кожи*. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016:224. [Chervonnaya L.V. *Pigmentnye novoobrazovaniya kozhi* [Pigmented skin neoplasms]. Moscow: GEOTAR-Media Publ.; 2016:224. (In Russian)].
10. Arya S., Manali J., Motilal B., Rajendra P.T. Giant congenital melanocytic nevus with limb hypoplasia and lipomatosis: A rare association. *Pigmentary Disorders*. 2016;3(2):238. DOI: 10.4172/2376-0427.1000238
11. Ersen B., Selçuk A., Ayse S., Mehmet C.Ş., Ismail A., Orhan T., Furkan K., Suleyman C. Clinical and histopathological analysis of 790 naevi excised from 509 patients due to cosmetic reasons. *Eur. J. Plast. Surg.* 2014;38:133–138. DOI: 10.1007/s00238-014-1041-6
12. Hong K.T., Jung M.L., Sang E.L. A treatment of medium-to-giant congenital melanocytic nevi with combined Er:YAG laser and long-pulsed alexandrite laser. *Med. Laser*. 2017;6(2):77–85. DOI: 10.25289/ML.2017.6.2.77
13. Kregel S., Scope A., Dusza S.W., Vonthein R., Marghoob A.A. New recommendations for the categorization of cutaneous features of congenital melanocytic nevi. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2013;68(3):441–451. DOI: 10.1016/j.jaad.2012.05.043
14. McCalmont T.H., Emanuel B., Fung M., Ruben B.S. Perineuromatous melanocytic nevi. *J. Cutan. Pathol.* 2011;38(12):940–942. DOI: 10.1111/j.1600-0560.2011.01820_2.x
15. Nguyen D., Pang J.-Y., Madill C., Novakovic D. Effects of 445-nm laser on vessels of chick chorioallantoic membrane with implications to microlaryngeal laser surgery. *The Laryngoscope*. 2021;131(6):E1950–E1956. DOI: 10.1002/lary.29354
16. Roh M.R., Eliades P., Gupta S., Tsao H. Genetics of melanocytic nevi. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2015;28(6):661–672. DOI: 10.1111/pcmr.12412

17. Roy K., Hayzen B.A., Page R.N., Googe P.B., Zeagler D., Mihm M.C. Jr. Recurrent nevus phenomenon: A clinicopathologic study of 357 cases and histologic comparison with melanoma with regression. *Mod Pathol.* 2009;22(5):611–617. DOI: 10.1038/modpathol.2009.22
18. Schaffer J.V. Pigmented lesions in children: when to worry. *Curr. Opin. Pediatr.* 2007;19(4):430–440. DOI: 10.1097/MOP.0b013e32825b0788
19. Sommer L.L., Barcia S.M., Clarke L.E., Helm K.F. Persistent melanocytic nevi: A review and analysis of 205 cases. *J. Cutan. Pathol.* 2011;38(6):503–507. DOI: 10.1111/j.1600-0560.2011.01692.x

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Подурар Станислав Александрович, ГБУЗ «Научно-исследовательский институт неотложной детской хирургии и травматологии» ДЗМ;
e-mail: podurar.stanislav@yandex.ru

Stanislav A. Podurar, Clinical and Research Institute of Emergency Pediatric Surgery and Trauma of the Moscow City Health Care Department;
e-mail: podurar.stanislav@yandex.ru

Горбатова Наталья Евгеньевна*, к.м.н., ГБУЗ «Научно-исследовательский институт неотложной детской хирургии и травматологии» ДЗМ;
e-mail: natashgorbatov@yandex.ru

Natalya E. Gorbatova*, Cand. Sci. (Med.), Clinical and Research Institute of Emergency Pediatric Surgery and Trauma of the Moscow City Health Care Department;
e-mail: natashgorbatov@yandex.ru

Брянцев Александр Владимирович, к.м.н., ГБУЗ «Научно-исследовательский институт неотложной детской хирургии и травматологии» ДЗМ;
e-mail: alex_br@doctor-roshal.ru

Alexander V. Bryantsev, Cand. Sci. (Med.), Clinical and Research Institute of Emergency Pediatric Surgery and Trauma of the Moscow City Health Care Department;
e-mail: alex_br@doctor-roshal.ru

Станкова Наталия Владимировна, к.б.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: snv@scbmt.ru

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

Тертычный Александр Семёнович, д.м.н., проф., ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет);
e-mail: atertychnyy@gmail.com

Aleksandr S. Tertychnyy, Dr. Sci. (Med.), Prof., I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University);
e-mail: atertychnyy@gmail.com

Варев Геннадий Александрович, к.т.н., ООО «Русский инженерный клуб»;
e-mail: info@lasermed.ru

Gennady A. Varev, Cand. Sci. (Tech.), Russian Engineering Club;
e-mail: info@lasermed.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author



ИССЛЕДОВАНИЕ *IN VIVO* АНТИ/ПРООКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ МЕТАЛЛООРГАНИЧЕСКОГО КООРДИНАЦИОННОГО ПОЛИМЕРА, МОДИФИЦИРОВАННОГО ОКСИДАМИ ЖЕЛЕЗА И АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТОЙ

Н.С. Тропская^{1,2,*}, Е.В. Клычникова¹, Н.В. Боровкова¹, А.К. Евсеев¹,
И.В. Горончаровская¹, М.В. Сторожева¹, Е.Н. Бородин¹, А.А. Кочетова¹,
Л.С. Бондаренко^{1,2}, Р.К. Баймуратова³, Г.И. Джардималиева³, К.А. Кыдралиева²

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

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

³ ФГБУН Федеральный исследовательский центр проблем химической физики
и медицинской химии РАН
142432, Российская Федерация, Московская обл., Черноголовка, пр-кт Академика Семенова, 1

Эксперименты выполнены на 39 крысах-самцах популяции линий Wistar. Металлоорганический координационный полимер, модифицированный оксидом железа и аскорбиновой кислотой (композит), вводили внутривенно здоровым крысам в дозах 25 и 50 мг/кг. Через 3 и 24 ч после введения оценивали его анти/прооксидантную активность. Установлено, что композит в обеих дозах не влияет в значительной степени на гомеостаз прооксидантов/антиоксидантов в сыворотке крови у здоровых животных. В высоких дозах композит усиливает апоптоз лимфоцитов, что свидетельствует о возможном его применении как катализатора свободно-радикальных процессов для дальнейшего использования в биомедицине.

Ключевые слова: металлоорганический координационный полимер, наночастицы оксидов железа, аскорбиновая кислота, анти/прооксидантная активность, крысы

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 22-73-10222.

Для цитирования: Тропская Н.С., Клычникова Е.В., Боровкова Н.В., Евсеев А.К., Горончаровская И.В., Сторожева М.В., Бородин Е.Н., Кочетова А.А., Бондаренко Л.С., Баймуратова Р.К., Джардималиева Г.И., Кыдралиева К.А. Исследование *in vivo* анти/прооксидантной активности металлоорганического координационного полимера, модифицированного оксидами железа и аскорбиновой кислотой. *Биомедицина*. 2024;20(3):114–120. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-3-114-120>

Поступила 15.04.2024

Принята после доработки 03.06.2024

Опубликована 10.09.2024

IN VIVO STUDY OF THE ANTI/PROOXIDANT ACTIVITY OF A METAL-ORGANIC COORDINATION POLYMER MODIFIED WITH IRON OXIDES AND ASCORBIC ACID

Nataliya S. Tropkaya^{1,2,*}, Elena V. Klychnikova¹, Natal'ya V. Borovkova¹,
Anatoly K. Evseev¹, Irina V. Goroncharovskaya¹, Mayya V. Storozheva¹,
Yevgeniya N. Borodina¹, Alena A. Kochetova¹, Lyubov S. Bondarenko^{1,2},
Roza K. Baimuratova³, Gulzhian I. Dzhardimalieva³, Kamilia A. Kydralieva²

¹ N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine of the Moscow City 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

³ Federal Research Center of Problems of Chemical Physics and Medical Chemistry
of the Russian Academy of Sciences
142432, Moscow Region, Chernogolovka, Akademika Semionova Ave., 1

Experiments on 39 male Wistar rats were performed. A metal-organic coordination polymer modified with iron oxide and ascorbic acid (composite) was administered intravenously to healthy rats at doses of 25 and 50 mg/kg. The anti/prooxidant activity of the composite was assessed 3 and 24 hours after administration. The composite in both doses was shown to have no significant effect on the homeostasis of prooxidants/antioxidants in the blood serum in healthy animals. In high doses, the composite enhances apoptosis of lymphocytes, which indicates its possible use as a catalyst for free radical processes for further use in biomedicine.

Keywords: metal-organic coordination polymer, iron oxide nanoparticles, ascorbic acid, anti/prooxidant activity, rats

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

Funding: the research was carried out with financial support from the Russian Science Foundation, grant No. 22-73-10222.

For citation: Tropkaya N.S., Klychnikova E.V., Borovkova N.V., Evseev A.K., Goroncharovskaya I.V., Storozheva M.V., Borodina Ye.N., Kochetova A.A., Bondarenko L.S., Baimuratova R.K., Dzhardimalieva G.I., Kydralieva K.A. *In vivo* Study of the Anti/Prooxidant Activity of a Metal-Organic Coordination Polymer Modified with Iron Oxides and Ascorbic Acid. *Journal Biomed.* 2024;20(3):114–120. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-3-114-120>

Submitted 15.04.2024

Revised 03.06.2024

Published 10.09.2024

Введение

К настоящему времени сформулирована патогенетическая концепция металл-индуцированного окислительного стресса в биологических системах, возникающего в результате нарушений гомеостаза ионов металлов и приводящего к повреждениям нуклеиновых кислот, перекисному окислению липидов, модификациям белков

и другим эффектам, лежащим в основе сердечно-сосудистых, онкологических заболеваний, диабета и другой патологии [3]. Ферроптоз — новая железозависимая форма программируемой гибели клетки, характеризуется активацией перекисного окисления липидов, которое зависит, среди прочего, от образования активных форм кислорода (АФК), накапливающихся в результате

реакции Фентона [4]. Металлоорганические координационные полимеры (МОКП) на основе железа являются эффективными катализаторами этой реакции [1]. В данной работе мы использовали МП-88В, трёхмерный пористый МОКП, состоящий из 1,4-бензолдикарбоновой кислоты и октаэдрических трёхъядерных кластеров Fe ($\text{Fe}_3\text{-}\mu_3\text{-оксо}$) и имеющий вакантные координационные центры, доступные для молекул перекиси водорода. МОКП был модифицирован аскорбиновой кислотой для ускорения окислительно-восстановительного цикла $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ и оксидом железа, в частности магнетитом Fe_3O_4 , для возможности в дальнейшем магнитного нацеливания.

Цель работы — оценить анти/прооксидантную активность металлоорганического координационного полимера, модифицированного оксидами железа и аскорбиновой кислотой, в экспериментах на лабораторных животных.

Материалы и методы

Исследования выполнены на 39 крысах-самцах популяции линий Wistar в возрасте 12 мес. массой тела 300–360 г. 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 освещенности с 8 до 20 часов — свет, с 20 до 8 часов — сумеречное освещение. Доступ к пище и воде до начала экспериментов был свободный.

Крысы (n=39) были разделены на 5 групп: 1-я — контрольная (интактные крысы, n=8); 2-я (n=8) и 3-я (n=7) — опытные, в/в введение композита в дозе 25 мг/кг (взятие крови через 3 и 24 ч после введения композита); 4-я (n=8) и 5-я (n=8) — опытные, в/в введение композита в дозе 50 мг/кг (взятие крови через 3 и 24 ч после введения композита).

Композит предварительно гомогенизировали в деионизированной воде в УЗ-бане при 30 кГц в течение 3 мин при 37°C. Затем растворяли в 1 мл физ. р-ра и вводили в латеральную хвостовую вену крыс. Животные хорошо переносили введение композита. На протяжении всего эксперимента летальных исходов не наблюдалось.

Крыс опытных групп через 3 и 24 ч после введения композита, а также крыс интактной группы выводили из эксперимента летальной дозой наркоза. Кровь для дальнейшего анализа забирали из каудальной вены. Были оценены параметры антиоксидантной/прооксидантной систем, а также раннего и позднего апоптоза лимфоцитов периферической крови.

Электрохимический анализ окислительно-восстановительных свойств сыворотки крови включал в себя измерение потенциала платинового электрода при разомкнутой цепи (ПРЦ), являющегося интегральным показателем окислительно-восстановительного баланса, и вольтамперметрическое определение общей антиоксидантной ёмкости сыворотки крови, выраженной количеством электричества (Q), затраченного на окисление низкомолекулярных антиоксидантов. Измерения проводили с помощью потенциостата «PC Pro L» (ЗАО «Кронас», Россия), согласно методикам, описанным в работе [2].

В сыворотке крови определяли маркер перекисного окисления липидов — малоновый диальдегид (МДА) по стандартной методике с использованием 2-тиобарбитуровой кислоты. Состояние антиоксидантной системы оценивали по показателю общей антиокислительной активности (ОАА) сыворотки крови, которую измеряли спектрофотометрическим методом на биохимическом анализаторе «Olympus AU2700» («Beckman Coulter», США) с использованием набора реактивов «TAS kit» («Randox», Великобритания).

Исследование уровня лейкоцитов в крови выполняли на гематологическом ана-

лизаторе «AcT Diff 2» («Beckman Coulter», США) по стандартной методике. Для определения апоптоза лимфоцитов кровь забирала в пробирки с ЭДТА, затем на градиенте плотности выделяли мононуклеары. Клетки отмывали буферным р-ром с ионами кальция. Далее проводили исследование апоптоза лимфоцитов с помощью набора «Annexin V-FITC/7AAD» на проточном цитометре «СУТОМІС FC500» («Beckman Coulter», США) по стандартной методике. На ранней стадии апоптоза целостность клеточной мембраны сохраняется, однако происходит перестройка её фосфолипидных компонентов и на поверхности клетки появляется фосфатидилсерин. Аннексин V способен связываться с фосфатидилсерином в присутствии кальция. Одновременное окрашивание клеток витальным ДНК-специфичным красителем 7-аминоактиномицином D (7AAD) позволяет дифференцировать клетки на ранних стадиях апоптоза (Annexin V+/7AAD-, ранний апоптоз) от клеток, уже погибших в результате апоптоза (Annexin V+/7AAD+, поздний апоптоз) [5].

Статистическую обработку данных проводили в программе Statistica 6.0 («StatSoft Inc.», США). Данные представлялись в виде медианы и процентилей. Для статистического анализа использовали непараметрические критерии. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Сравнительная оценка показателей крови опытных групп с интактной при внутривенном введении композита в различных дозах в разные сроки наблюдения у здоровых животных представлена в таблице.

При исследовании влияния композита на баланс прооксидантов и антиоксидантов было обнаружено, что применение композита в дозе 25 мг/кг приводит к статистически значимому снижению МДА ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой

как через 3, так и 24 ч после введения композита. Через 3 ч в сыворотке крови наблюдали тенденцию к падению относительного содержания лимфоцитов на 12% ($p > 0,05$), что сопровождалось снижением (на 28%, $p < 0,05$) концентрации лимфоцитов в раннем апоптозе и тенденцией к повышению концентрации уже погибших лимфоцитов (поздний апоптоз) (в 2 раза, $p > 0,05$). Через 24 ч значения описываемых показателей возвращались к значениям контрольной группы.

При применении композита в дозе 50 мг/кг через 3 ч в сыворотке крови наблюдали снижение относительного содержания лимфоцитов на 22% ($p < 0,05$), что сопровождалось тенденцией к увеличению (в 3 раза, $p > 0,05$) концентрации лимфоцитов в раннем апоптозе и концентрации уже погибших лимфоцитов (поздний апоптоз) (в 2 раза, $p > 0,05$). Через 24 ч значения описываемых показателей возвращались к значениям контрольной группы. Однако в эти сроки наблюдалось статистически значимое снижение Q на 14% по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$).

Анализ полученных данных свидетельствует о том, что применение композита в двух дозах в различные сроки после его внутривенного введения не изменяет интегральный показатель окислительно-восстановительного баланса (по данным ПРЦ) и функциональное состояние как эндогенной антиоксидантной системы, так и экзогенных антиоксидантов сыворотки крови здоровых животных (по данным ОАА).

Тем не менее введение композита оказывается неиндифферентным для организма здоровых животных. Так, наблюдаемое снижение МДА (при введении композита в низкой дозе), возможно, связано с присутствием в структуре композита аскорбиновой кислоты, которая является низкомолекулярным антиоксидантом. При этом введение композита в высокой дозе не влияло на уровень МДА, однако

Таблица. Показатели крови при внутривенном введении композита в различных дозах в разные сроки наблюдения у здоровых животных

Table. Blood parameters during intravenous administration of the composite in various doses at different observation periods in healthy animals

Параметры	Группы				
	контроль 1 (интактная)	опытная 2 25 мг/кг (3 ч)	опытная 3 25 мг/кг (24 ч)	опытная 4 50 мг/кг (3 ч)	опытная 5 50 мг/кг (24 ч)
ПРЦ, мВ	-66,1 (-78,7; -62,2)	-73,9 (-80,4; -71)	-65,4 (-80,9; -63,7)	-68,3 (-79,7; -63,5)	-66,0 (-73,4; -63,1)
Q, мкКл	9,1 (8,6; 10,3)	8,6 (8,1; 9,9)	9,6 (7,7; 10,2)	8,5 (7,6; 9,8)	7,8 (6,7; 8,2)*
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	8,9 (7; 10,6)	9,4 (7,6; 11,9)	6,5 (4,8; 7,6)	10,3 (9; 11,8)	7,1 (6,6; 9,3)
Лимфоциты, %	74,4 (64; 85,9)	65,6 (56,7; 75,5)	74,6 (67,8; 82)	57,9 (52,6; 61,3)*	81,9 (78,7; 87,4)
Ранний апоптоз лимфоцитов, %	2,5 (2,3; 4,1)	1,8 (1,7; 2)*	3,1 (2,4; 3,4)	3,8 (2,5; 6)	1,9 (1,5; 2,8)
Поздний апоптоз лимфоцитов, %	0,005 (0; 0,01)	0,01 (0,01; 0,02)	0,01 (0; 0,02)	0,015 (0,005; 0,02)	0,01 (0,005; 0,01)
МДА, мкмоль/л	5,4 (5,1; 6,6)	4,5 (3,9; 4,9)*	4,8 (4,4; 4,8)*	5 (4,8; 6)	4,9 (4,1; 5,7)
ОАА, ммоль/л	1,01 (0,94; 1,05)	1,04 (0,96; 1,10)	1,07 (0,98; 1,10)	1,02 (1,01; 1,06)	1,04 (1; 1,05)

Примечание: * — $p < 0,05$, отличия статистически значимы в сравнении опытных групп с контрольной группой. При сравнении данных использовали непараметрический U-критерий Манна — Уитни.

Note: * $p < 0,05$, the differences are statistically significant when comparing the experimental groups with the control group. When comparing data, the nonparametric Mann–Whitney U test was used.

вызывало снижение показателя Q, который как раз и отражает уровень низкомолекулярных антиоксидантов. Возможно, в данной концентрации аскорбиновая кислота не проявляет свои антиоксидантные свойства. Применение композита в высоких дозах через 3 ч после введения приводит к относительной лимфопении и, возможно, к усилению апоптоза лимфоцитов, что связано с накоплением АФК, способствующих гибели клеток.

Выводы

1. Композит в дозах 25 и 50 мг/кг (внутривенно) не влияет в значительной степени на гомеостаз прооксидантов/антиоксидантов в сыворотке крови у здоровых животных.
2. В высоких дозах композит усиливает апоптоз лимфоцитов, что свидетельствует о возможном его применении в качестве катализатора свободно-радикальных процессов для дальнейшего использования в биомедицине.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Cheng M., Lai C., Yang L., Zeng G., Huang D., Zhang C., Qin L., Hu L., Zhou C., Xiong W. Metal-organic frameworks for highly efficient heterogeneous Fenton-like catalysis. *Coordination Chemistry Reviews*. 2018;368:80–92. DOI: 10.1016/j.ccr.2018.04.012
2. Goroncharovskaya I.V., Evseev A.K., Shabanov A.K., Denisenko O., Kuzovlev A.N., Klychnikova E.V., Tazina E.V., Petrikov S.S. Electrochemical methods for assessment of polytrauma outcomes. *Electroanalysis*. 2021;33(2):550–557. DOI: 10.1002/elan.202060356
3. Jomova K., Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*. 2011;283(2–3):65–87. DOI: 10.1016/j.tox.2011.03.001
4. Kim J.W., Lee J.Y., Oh M., Lee E.W. An integrated view of lipid metabolism in ferroptosis revisited via lipidomic analysis. *Exp. Mol. Med.* 2023;55(8):1620–1631. DOI: 10.1038/s12276-023-01077-y
5. Lecoeur H., Ledru E., Prevost M.-C., Gougeon M.-L. Strategies for phenotyping apoptotic peripheral human lymphocytes comparing ISNT, annexin-V and 7-AAD cytofluorometric staining methods. *J. Immunol. Methods*. 1997;209(2):111–123. DOI: 10.1016/S0022-1759(97)00138-5

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Тропская Наталья Сергеевна*, д.б.н., ГБУЗ «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 City Health Care Department; Moscow Aviation Institute (National Research University);
e-mail: ntropskaya@mail.ru

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

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

Боровкова Наталья Валерьевна, д.м.н., ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗМ»;
e-mail: borovkovanv@yandex.ru

Natal'ya V. Borovkova, Dr. Sci. (Med.), N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine of the Moscow City Health Care Department;
e-mail: borovkovanv@yandex.ru

Евсеев Анатолий Константинович, д.х.н., ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗМ»;
e-mail: anatolevseev@gmail.com

Anatoly K. Evseev, Dr. Sci. (Chem.), N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine of the Moscow City Health Care Department;
e-mail: anatolevseev@gmail.com

Горончаровская Ирина Викторовна, к.х.н., ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗМ»;
e-mail: goririna22@gmail.com

Irina V. Goroncharovskaya, Cand. Sci. (Chem.), N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine of the Moscow City Health Care Department;
e-mail: goririna22@gmail.com

Сторожева Майя Викторовна, ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗМ»;
e-mail: mayya.storozheva@yandex.ru

Mayya V. Storozheva, N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine of the Moscow City Health Care Department;
e-mail: mayya.storozheva@yandex.ru

Бородин Евгений Никитична, ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗМ»;
e-mail: januaria@list.ru

Yevgeniya N. Borodina, N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine of the Moscow City Health Care Department;
e-mail: januaria@list.ru

Кочетова Алена Алексеевна, ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗМ»;
e-mail: KochetovaAA@sklif.mos.ru

Alena A. Kochetova, N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine of the Moscow City Health Care Department;
e-mail: KochetovaAA@sklif.mos.ru

Бондаренко Любовь Сергеевна, к.х.н., ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗМ», ФГБОУ ВО «Московский авиационный институт (национальный исследовательский университет)»;
e-mail: L.s.bondarenko92@gmail.com

Баймуратова Роза Курмангалиевна, к.х.н., ФГБУН Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии РАН;
e-mail: roz_baz@mail.ru

Джардималиева Гульжиян Исаковна, д.х.н., ФГБУН Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии РАН;
e-mail: dzhardim@icp.ac.ru

Кыдралиева Камиля Асылбековна, д.х.н., ФГБОУ ВО «Московский авиационный институт (национальный исследовательский университет)»;
e-mail: kydralievaka@mai.ru

Lyubov S. Bondarenko, Cand. Sci. (Chem.), N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine of the Moscow City Health Care Department, Moscow Aviation Institute (National Research University);
e-mail: L.s.bondarenko92@gmail.com

Roza K. Baimuratova, Cand. Sci. (Chem.), Federal Research Center of Problems of Chemical Physics and Medical Chemistry of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: roz_baz@mail.ru

Gulzhian I. Dzhardimalieva, Dr. Sci. (Chem.), Federal Research Center of Problems of Chemical Physics and Medical Chemistry of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: dzhardim@icp.ac.ru

Kamilia A. Kydralievka, Dr. Sci. (Chem.), Moscow Aviation Institute (National Research University);
e-mail: kydralievaka@mai.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

<https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-3-121-124>



ОТЛИЧИЯ В ПОСТАНОВКЕ МОДЕЛИ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЫ И ПОСЛЕДУЮЩЕЙ ПОВЕДЕНЧЕСКОЙ ОЦЕНКЕ У КРЫС И МЫШЕЙ

С.А. Червонецкий*, А.А. Паймулина, Н.О. Селизарова

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

Последствия черепно-мозговой травмы (ЧМТ) являются различными и зачастую плохо предсказуемыми. Они могут проявляться как в остром, так и в отдалённом периоде, а также манифестировать нейродегенеративные заболевания спустя годы и даже десятилетия после травмы. Учитывая гетерогенную природу ЧМТ у человека, доклинические исследования необходимо проводить на разных тест-системах. В настоящее время предпочтение отдаётся грызунам, ввиду их доступности и низкой стоимости. Однако выбор тест-системы для исследования должен основываться не только на экономической и логистической составляющих, но и на видовых физиологических особенностях.

Ключевые слова: черепно-мозговая травма, поведенческие тесты, крысы, открытое поле, мыши

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Червонецкий С.А., Паймулина А.А., Селизарова Н.О. Отличия в постановке модели черепно-мозговой травмы и последующей поведенческой оценке у крыс и мышей. *Биомедицина*. 2024;20(3):121–124. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-3-121-124>

Поступила 15.04.2024

Принята после доработки 03.06.2024

Опубликована 10.09.2024

DIFFERENCES IN MODELS OF TRAUMATIC BRAIN INJURY AND THE SUBSEQUENT BEHAVIOR ASSESSMENT IN RATS AND MICE

Sergey A. Chervonetsky*, Alexandra A. Paimulina, Natalya O. Selizarova

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

Traumatic brain injury (TBI) is associated with varied and unpredictable consequences, which can be manifested during both acute and long-term periods. Such consequences may lead to the development of neurodegenerative diseases years and even decades after the injury. Given the heterogeneous nature of TBI in humans, preclinical studies need to be conducted using different test systems. Currently, preference is given to rodents due to their availability and low cost. However, the choice of test systems for research should be based not only on economic and logistical components, but also on their specific physiological characteristics.

Keywords: traumatic brain injury, behavior tests, rats, open field, mice

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

For citation: Chervonetsky S.A., Paimulina A.A., Selizarova N.O. Differences in Models of Traumatic Brain Injury and the Subsequent Behavior Assessment in Rats and Mice. *Journal Biomed.* 2024;20(3):121–124. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-3-121-124>

Submitted 15.04.2024

Revised 03.06.2024

Published 10.09.2024

Введение

Черепно-мозговая травма (ЧМТ) представляет собой серьёзную проблему здравоохранения во всём мире. Это связано не только с высоким уровнем летальности, инвалидизации, социально-экономического ущерба, но и с функциональными нарушениями и структурными изменениями, проявляющимися в перспективе после ЧМТ [1, 2]. Ввиду своей сложности и непредсказуемости последствий, а также универсальности каждого организма не существует двух одинаковых травм. Следовательно, ни одна из известных в доклинических исследованиях моделей не может детально воспроизвести травму. Однако моделирование травмы позволяет воспроизвести почти идентичные повреждения, необходимые для чёткого понимания клинической картины [8].

Цель работы — показать отличия между крысами и мышами, которые необходимо учитывать при постановке модели контролируемого кортикального удара.

Материалы и методы

Для достижения цели работы проведён обзор литературных источников по тематике со следующих баз данных: PubMed, eLIBRARY, Springer Link.

Результаты и их обсуждение

Наиболее часто используемая тест-система для постановки ЧМТ — крысы. Эффекты контролируемого кортикального удара на них достаточно хорошо изучены и классифицированы. Однако за счёт растущей доступности нокаутных и трансген-

ных мышей у исследователей появилась возможность изучать влияние различных генов на повреждение и процессы регенерации.

На сегодняшний день представлено большое количество протоколов, описывающих порядок действий для постановки контролируемого кортикального удара. И хотя большинство протоколов схожи, между ними присутствуют отличия. С одной стороны, они могут быть незначительными и связаны с используемым оборудованием, инструментами. С другой стороны, возможно использовать разные препараты для погружения животного в наркоз и отличные способы введения.

Описаны как различные параметры для крыс и мышей, так и действия, способные повлиять на характер повреждения и дальнейшую оценку состояния (табл.).

Определённые отличия имеются в действиях после трепанации и нанесения повреждения. Ряд специалистов предлагают закрыть трепанационный дефект костным воском, либо ранее высверленным костным лоскутом [5]. Авторы других протоколов рекомендуют ушить разрез кожи без закрытия краниоэктомии. Они объясняют это тем, что костный лоскут может вызвать вторичное повреждение, оказывая давление на травмированные ткани. Рассматривая мышинные модели, стоит отметить, что трепанационный дефект спиливается, а не высверливается [6].

Оценка поведения грызунов после черепно-мозговой травмы — одна из важнейших методик, направленных на описание состояния животного. Существует большое количество тестов, позволяющих

Таблица. Отличительные параметры для крыс и мышей в постановке контролируемого кортикального удара
Table. Distinctive parameters for rats and mice in setting a controlled cortical impact

Вид	Область травмы	Размер краниотомии (мм)	Диаметр наконечника (мм)	Скорость (м/с)	Время сдвигания (мс)	Глубина (мм)
Мышь	Теменная кора	4–5	3	4–6	50–250	0,5–2,5
Крыса	Теменная кора, Моторная кора	6–8	5–6	4	50–250	1–3

проанализировать локомоторную функцию, пространственную память, общую исследовательскую активность и другие функции. Для многих из них требуется специальное оборудование. В большинстве случаев оно отличается размером. Однако в некоторых стоит учитывать и другие условия.

Тест «Открытое поле» (ОП)

Возраст. Сообщается, что молодые крысы проявляют большую исследовательскую активность, чем старые. Для мышей это точно не определено, хотя и не исключается, что возраст связан с увеличением активности [4].

Пол. Исследования выявили как сходства, так и значительные половые различия. В одном из исследований самцы нескольких линий были более активны, чем самки (в т. ч. D2, C3H, Balb и B6129F1), а у нескольких других линий различий между полами не наблюдалось. В экспериментах, где исследование проводилось на крысах, авторы наблюдали большую локомоторную активность у самок по сравнению с самцами [3].

Условия содержания. Изолированное содержание мышей приводит как к снижению, так и к повышению исследовательской активности. В то время как крысы, содержа-

щиеся отдельно, демонстрируют снижение активности.

Предшествующие эксперименты. Проведение других поведенческих тестов на мышах перед ОП может снижать активность. Также сообщается о влиянии штамма на поведение мышей. У крыс большинство имеющихся данных свидетельствуют о том, что повторное воздействие ОП приводит к снижению активности.

Изучение пространственной памяти у грызунов проводится с помощью тестов «лабиринт Барнса» и «водный тест Морриса». Для крыс лабиринт Морриса более предпочтителен, в то время как у мышей тренировка в водном лабиринте в течение 30 мин повышает уровень кортикостерона. Это может быть результатом эндогенного стресса, способного влиять на результаты тестирования и дальнейшую интерпретацию [7].

Закключение

Планирование исследований по черепно-мозговой травме должно учитывать анатомо-физиологические особенности потенциальной тест-системы. Детальное понимание постановки модели и дальнейшей оценки минимизирует ошибки и неверную интерпретацию данных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

- Приходько В.А., Кан А.В., Сысоев Ю.И., Титович И.А., Анисимова Н.А., Оковитый С.В. Оценка нейропротекторной активности нового производного аллилморфолина на модели черепно-мозговой травмы у крыс. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2021;10(S4):179–187. [Prikhodko V.A., Kan A.V., Sysoev Yu.I., Titovich I.A., Anisimova N.A., Okovityi S.V. Evaluation of the neuroprotective activity of a new allylmorpholine derivative in a rat model of traumatic brain injury]. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv* [Drug development & regis-

- tration]. 2021;10(S4):179–187. (In Russian)]. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-179-187
2. Bajwa N.M., Kesavan C., Mohan S. Long-term consequences of traumatic brain injury in bone metabolism. *Front. Neurol.* 2018;9:115. DOI: 10.3389/fneur.2018.00115
 3. Bolivar V.J., Caldarone B.J., Reilly A.A., Flaherty L. Habituation of activity in an open field: A survey of inbred strains and F1 hybrids. *Behav. Genet.* 2000;30(4):285–293. DOI: 10.1023/A:1026545316455
 4. Dixon L.K., Defries J.C. Development of open field behavior in mice: Effects of age and experience. *Dev. Psychobiol.* 1968;1(2):100–107. DOI: 10.1002/dev.420010207
 5. Feeny D.M., Boyeson M.G., Linn R.T., Murray H.M., Dail W.G. Responses to cortical injury: I. methodology and local effects of contusions in the rat. *Brain Research.* 1981;211(1):67–77. DOI: 10.1016/0006-8993(81)90067-6
 6. Furmanski O., Nieves M.D., Doughty M.L. Controlled cortical impact model of mouse brain injury with therapeutic transplantation of human induced pluripotent stem cell-derived neural cells. *J. Vis. Exp.* 2019;149. DOI: 10.3791/59561
 7. Harrison F.E., Hosseini A.H., McDonald M.P. Endogenous anxiety and stress responses in water maze and Barnes maze spatial memory tasks. *Behav. Brain Res.* 2009;198(1):247–251. DOI: 10.1016/j.bbr.2008.10.015
 8. Romine J., Gao X., Chen J. Controlled cortical impact model for traumatic brain injury. *J. Vis. Exp.* 2014;90:e51781. DOI: 10.3791/51781

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Червонецкий Сергей Артурович*, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России;
e-mail: chervoneckij.sergej@spcpcu.ru

Sergey A. Chervonetsky*, Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: chervoneckij.sergej@spcpcu.ru

Паймулина Александра Александровна, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России;
e-mail: aleksandra.pajmulina@spcpcu.ru

Alexandra A. Paimulina, Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: aleksandra.pajmulina@spcpcu.ru

Селизарова Наталья Олеговна, к.м.н., доц., ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет Минздрава России;
e-mail: natalia.selizarova@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

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

<https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-3-125-129>



АСПЕКТЫ СОВМЕСТНОГО ПРИМЕНЕНИЯ АНТИКОАГУЛЯНТНЫХ И ГЕМОСТАТИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ПРИ ЭНДОПРОТЕЗИРОВАНИИ КРУПНЫХ СУСТАВОВ

Л.С. Головко¹, А.В. Сафроненко², Е.В. Ганцгорн^{2,*}, М. Вехбх², И.М. Маллеев², А.А. Балоян², Р.М. Манвелян², Е.В. Рашкова²

¹ ГБУ Ростовской области «Областная клиническая больница № 2»
Минздрава Ростовской области
344029, Российская Федерация, Ростов-на-Дону, ул. 1-й Конной Армии, 33

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

В статье представлен краткий обзор современного взгляда на проблему совместного применения лекарственных средств разнонаправленного спектра действия, антикоагулянтов и гемостатиков, в «большой» ортопедии при эндопротезировании крупных суставов нижних конечностей. Проанализированы различные режимы использования антикоагулянтной профилактики на фоне назначения гемостатических лекарственных средств.

Ключевые слова: антикоагулянты, гемостатики, тромбоз, геморрагические осложнения, эндопротезирование

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Головко Л.С., Сафроненко А.В., Ганцгорн Е.В., Вехбх М., Маллеев И.М., Балоян А.А., Манвелян Р.М., Рашкова Е.В. Аспекты совместного применения антикоагулянтных и гемостатических лекарственных средств при эндопротезировании крупных суставов. *Биомедицина*. 2024;20(3):125–129. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-3-125-129>

Поступила 09.04.2024

Принята после доработки 17.04.2024

Опубликована 10.09.2024

ASPECTS OF THE COMBINED USE OF ANTICOAGULANT AND HEMOSTATIC DRUGS IN LARGE JOINT ENDOPROSTHETICS

Lilia S. Golovko¹, Andrey V. Safronenko², Elena V. Gantsgorn^{2,*}, Mhammad Wehbh², Ibragim M. Malleev², Artur A. Baloyan², Roland M. Manvelyan², Ekaterina V. Rashkova²

¹ Regional Clinical Hospital No. 2 of the Ministry of Health Care of Rostov Region
344029, Russian Federation, Rostov-on-Don, Pervoy Konnoy Armii Str., 33

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

The article presents a brief overview of the modern view on the problem of the combined use of drugs with a multidirectional spectrum of action, anticoagulants and hemostatics, in major orthopedics among patients with endoprosthetics of large joints of the lower extremities. Variable prescription regimens of anticoagulant prophylaxis against the background of using hemostatic drugs were analyzed.

Keywords: anticoagulants, hemostatic drugs, thrombosis, hemorrhagic complications, arthroplasty

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

For citation: Golovko L.S., Safronenko A.V., Gantsgorn E.V., Wehbh M., Malleev I.M., Baloyan A.A., Manvelyan R.M., Rashkova E.V. Aspects of the Combined Use of Anticoagulant and Hemostatic Drugs in Large Joint Endoprosthetics. *Journal Biomed.* 2024;20(3):125–129. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-3-125-129>

Submitted 09.04.2024

Revised 17.04.2024

Published 10.09.2024

Тотальное эндопротезирование суставов на сегодняшний день является одним из наиболее эффективных методов лечения при терминальной стадии остеоартроза, которое позволяет уменьшить болевой синдром, улучшить функцию сустава и расширить двигательный режим пациента [8]. Периоперационная кровопотеря при выполнении операций по замене суставов может превышать 1000 мл. В различных источниках литературы зафиксировано, что массивная кровопотеря может увеличить риск развития других периоперационных осложнений, что дополнительно обуславливает применение гемостатических лекарственных средств (ЛС) для снижения объёма кровопотери [3]. Помимо геморрагических осложнений, у пациентов, нуждающихся в эндопротезировании крупных суставов, наблюдается высокая вероятность развития венозных тромбозно-эмболических осложнений, что является причиной назначения антикоагулянтных ЛС [1]. Потребность в практически одновременном назначении физиологически непрямым антагонистов объясняет интерес медицинского научного сообщества к всестороннему изучению данной проблемы и поиску ответов на следующие вопросы: какие именно ЛС следует назначать, какой схемы назначения придерживаться, какие факторы могут быть ассоциированы с повышенным риском развития тромбозно-геморрагических осложнений и т. д.

Немалое число исследователей акцентировали свой научный интерес на изучении эффективности и безопасности сочетаний разных схем антитромботических и гемо-

статических ЛС. Зачастую из антиромботических средств изучаются антикоагулянты, но некоторые исследователи в круг исследуемых препаратов включают и антиагреганты. Так, например, авторы работы [8] провели проспективное исследование среди 180 пациентов, перенёвших эндопротезирование коленного сустава. Всем пациентам интраоперационно капельно вводили транексамовую кислоту в дозе 60 мг/кг. После этого пациенты были разделены на три группы (по 60 чел. в каждой). В 1-ю группу были включены пациенты, получавшие перорально ривароксабан в дозе 10 мг, во 2-ю группу — подкожно далтепарин натрия в дозе 2500 МЕ, а в 3-й группе больным перорально назначали ацетилсалициловую кислоту в дозе 100 мг. Антиромботические средства назначали через 12 ч после операции, а затем раз в сутки в течение 30 дней. Средний объём отделяемого по дренажам после лечения был значительно ниже в 3-й группе, чем в 1-й и 2-й группах ($205,2 \pm 69,0$ мл против $243,4 \pm 72,5$ мл и против $295,4 \pm 72,5$ мл; $p < 0,001$), причём между 1-й и 2-й группами была выявлена статистически значимая разница ($243,4 \pm 72,5$ мл против $295,4 \pm 72,5$ мл; $p < 0,001$). Частота гемотрансфузий во 2-й группе была выше по сравнению с 1-й и 3-й группами (20% против 6,7% против 5%; $p = 0,01$). Частота кровотечений в 1-й группе была выше, чем во 2-й и 3-й (26,7% против 10% против 8,3%; $p = 0,008$). Выраженной разницы в частоте тромботических осложнений между тремя группами выявлено не было [8].

Авторы работы [7] провели проспективное когортное исследование с участием 385 паци-

ентов, которым было проведено эндопротезирование коленного сустава, выполненное с введением и без введения транексамовой кислоты. Сравнивали объём кровопотери и потребность в переливании крови среди пациентов, получавших антитромботическое лечение на регулярной основе перед операцией, и тех, у кого подобная терапия не применялась. Транексамовую кислоту использовали однократно внутривенно в дозе 30 мг/кг, после операции для профилактики венозных тромбозмобилических осложнений использовали ривароксабан 10 мг, если не было противопоказаний. Транексамовую кислоту назначали 62% пациентам, которые получали предварительную антитромботическую терапию, и до 90% больных, у которых эта терапия отсутствовала. В обеих группах исследования объём кровопотери был значительно ниже у пациентов, получавших транексамовую кислоту ($p < 0,001$). Осложнений, в т. ч. тромбозов и кровотечений, развилось больше в группе получавших транексамовую кислоту и без регулярного назначения антитромботических ЛС до операции, однако эта разница не была статистически значимой [7].

В работе [4] был изучен вопрос: будут ли разные схемы внутривенного применения транексамовой кислоты — трёхчасовое двухдневное назначение («короткая» схема) и 11-часовое четырёхразовое введение («длинная» схема) — более эффективными, чем плацебо в снижении периперационной кровопотери у пациентов с эндопротезированием тазобедренного сустава, которым назначали ривароксабан для профилактики тромботических осложнений. Транексамовая кислота значительно снижала периперационную кровопотерю по сравнению с группой плацебо ($p < 0,001$); средние различия были 525,3 мл («короткая» схема против плацебо) и 550,1 мл («длинная» схема против плацебо). О венозных или артериальных тромбозмобилических осложнениях не сообщалось [4].

В работе [5] приводятся данные, что применение транексамовой кислоты в сочетании с эноксапаринем натрия по сравнению с группой без гемостатика у пациентов после замены тазобедренного сустава достоверно снижает объём кровопотери во время операции, объём общей кровопотери ($p < 0,001$) и потребность в переливании крови ($p = 0,029$). Однако в исследовании отсутствуют данные о развившихся тромбозах после операции.

Авторы работы [2] проанализировали эффективность и безопасность пероральных антикоагулянтов в сочетании с транексамовой кислотой при замене тазобедренного сустава. Все пациенты получали 40 мг эноксапарина натрия за 12 ч до операции и в день операции, затем пациенты получали либо 10 мг ривароксабана (40 пациентов), либо 220 мг дабигатрана (42 пациента) или 40 мг эноксапарина (39 пациентов). У всех пациентов рутинно использовалась транексамовая кислота в дозе 10–20 мг/кг. Гемостатик вводился за 30 мин до операции и через 6 ч после первой инфузии. Незначительное кровотечение наблюдалось только в группе ривароксабана. При выписке из больницы частота тромбоза глубоких вен составляла 12,5% в группе ривароксабана, 7% — в группе дабигатрана и 8% — в группе эноксапарина ($p > 0,05$) [2].

Помимо анализа наиболее эффективных и безопасных сочетаний ЛС в периперационном периоде, не менее важна конкретизация временных промежутков назначений препаратов. Так, в нашем ретроспективном исследовании была статистически достоверно продемонстрирована важность соблюдения временного интервала не менее 18 ч между применением гемостатических и антитромботических ЛС. Также в работе были проанализированы, какие факторы со стороны соматического статуса пациентов, показатели исходной коагулограммы были статистически значимо ассоциированы с более высоким ри-

ском развития геморрагических и тромбоэмболических осложнений [6].

Заключение

Таким образом, несмотря на уже определённый накопленный пул знаний по озвученной теме, исследования по данной тематике сохраняют свою актуальность, т. к. до сих пор нет единого мнения, в каких конкретно клинических ситуациях и в каких режимах стоит применять ту или иную комбинацию ЛС гемостатического и антитромботического спектра действия. Целесообразно продолжать проводить исследования в выше озвученных направлениях, чтобы не только расширить

пласт накопленных теоретических сведений в этой области, но и разрабатывать, оптимизировать практические риск-ориентированные (с учётом индивидуальных особенностей пациентов) подходы к профилактике тромбогеморрагических осложнений. В т. ч. это актуально не только для пациентов, которым необходимо эндопротезирование крупных суставов, но и для пациентов иных хирургических направлений, где высокий риск тромбозов также может идти «рука об руку» с повышенным риском кровотечений и массивной кровопотерей в периоперационном периоде, как, например, в акушерско-гинекологической практике или в онкологии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

- Божкова С.А., Касимова А.Р., Накопия В.Б., Корнилов Н.Н. Всё ли мы знаем о профилактике венозных тромбоэмболических осложнений после больших ортопедических операций? *Травматология и ортопедия России*. 2018;24(1):129–143. [Bozhkova S.A., Kasimova A.R., Nakopia V.B., Kornilov N.N. Vse li my znamo o profilaktike vnoznykh tromboembolicheskikh oslozhneniy posle bol'shikh ortopedicheskikh operatsiy? [Do we know all about prevention of venous thromboembolism after major orthopedic surgery?]. *Traumatology and Orthopedics of Russia*. 2018;24(1):129–143. (In Russian)]. DOI: 10.21823/2311-2905-2018-24-1-129-143.
- Жирова Т.А., Лыков М.С., Зырянов М.Н., Бабушин В.Н. Новые пероральные антикоагулянты в структуре тромбопрофилактики на фоне рутинного использования транексамовой кислоты при эндопротезировании тазобедренного сустава. *Анестезиология и реаниматология*. 2014;59(6):34–38. [Zhirova T.A., Lykov M.S., Zyryanov M.N., Babushkin V.N. Novye peroral'nye antikoagulyanty v strukture tromboprophilaktiki na fone rutinnogo ispol'zovaniya traneksamovoy kisloty pri endoprotezirovaniy tazobedrennogo sustava [New oral anticoagulants for thromboprophylaxis routine use of tranexamic acid after hip joint replacement]. *Anesthesiology and Reanimatology*. 2014;59(6):34–38. (In Russian)].
- Лебедь М.Л., Кирпиченко М.Г., Шамбурова А.С., Сандакова И.Н., Бочарова Ю.С., Попова В.С., Карманова М.М., Фесенко М.А., Голуб И.Е. Соотношение наружной и расчётной кровопотери при эндопротезировании крупных суставов нижней конечности. *Полутравма*. 2020;2:29–35. [Lebed M.L., Kirpichenko M.G., Shamburova A.S., Sandakova I.N., Bocharova Yu.S., Popova V.S., Karmanova M.M., Fesenko M.A., Golub I.E. Sootnoshenie naruzhnoy i raschetnoy krvopoteri pri endoprotezirovaniy krupnykh sustavov nizhney konechnosti [The ratio of external and calculated blood loss in arthroplasty of large joints of the lower extremity]. *Polytrauma*. 2020;2:29–35. (In Russian)]. DOI: 10.24411/1819-1495-2020-10017
- Clavé A., Gérard R., Lacroix J., Baynat C., Danguy des Déserts M., Gatineau F., Mottier D. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial on the efficacy of tranexamic acid combined with rivaroxaban thromboprophylaxis in reducing blood loss after primary cementless total hip arthroplasty. *Bone Joint J*. 2019;101-B(2):207–212. DOI: 10.1302/0301-620X.101B2.BJJ-2018-0898.R1
- Fraval A., Duncan S., Murray T., Duggan J., Tirosh O., Tran P. OBTAIN E: Outcome benefits of tranexamic acid in hip arthroplasty with enoxaparin: A randomised double-blinded controlled trial. *HIP International*. 2019;29(3):239–244. DOI: 10.1177/1120700018780125
- Golovko L.S., Safronenko A.V., Gantsgorn E.V., Sukhorukova N.V., Kapliev A.V. Development of a risk-oriented algorithm for the combined use of hemostatics and anticoagulants to prevent thrombosis and bleeding cases after total arthroplasty of knee or hip joints. *Research Results in Pharmacology*. 2021;7(1):65–74. DOI: 10.3897/rpharmacology.7.65708
- Hourlier H., Fennema P. Tranexamic acid use and risk of thrombosis in regular users of antithrombotics undergoing primary total knee arthroplasty: A prospective cohort study. *Blood Transfus*. 2018;16(1):44–52. DOI: 10.2450/2016.0160-16
- Zhou L.B., Wang C.C., Zhang L.T., Wu T., Zhang G.Q. Effectiveness of different antithrombotic agents in combination with tranexamic acid for venous thromboembolism prophylaxis and blood management after total knee replacement: A prospective randomized study. *BMC Musculoskelet Disord*. 2023;24(1):5. DOI: 10.1186/s12891-022-06117-8

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Головко Лилия Сергеевна, к.м.н., ГБУ Ростовской области «Областная клиническая больница № 2» Минздрава Ростовской области;
e-mail: liliya_s_golovko@mail.ru

Lilia S. Golovko, Cand. Sci. (Med.), Regional Clinical Hospital No. 2 of the Ministry of Health Care of Rostov Region;
e-mail: liliya_s_golovko@mail.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

Вехбх Мхаммад, ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России;
e-mail: mhammad.wehbh@bk.ru

Mhammad Wehbh, Rostov State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: mhammad.wehbh@bk.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

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

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

Рашкова Екатерина Вячеславовна, ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России;
e-mail: Ekaterina.raschkova2002@gmail.com

Ekaterina V. Rashkova, Rostov State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: Ekaterina.raschkova2002@gmail.com

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

РОЛЬ АЛЬТЕРНАТИВНОГО СПЛАЙСИНГА В ОНКОГЕНЕЗЕ

О.М. Куделина^{1,*}, А.В. Сафроненко¹, М.Х.-Б. Бураева¹, М.Х.-Б. Бураева²,
С.А. Величко¹, Д.А. Терехова¹, Н.С. Бендерский², А.А. Толстой¹

¹ ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России
344022, Российская Федерация, Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29

² ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России
344037, Российская Федерация, Ростов-на-Дону, ул. 14-я линия, 63

За последние два десятилетия накопилось много фактических данных, которые подтверждают решающую роль альтернативного сплайсинга в процессе онкогенеза. При более подробном изучении механизмов сплайсинга было выявлено, что нацеливание на центральный процесс для атипичных клеток может стать потенциально новым подходом в лечении злокачественных новообразований. Во-первых, специфические изоформы белка, образующиеся в результате альтернативного сплайсинга и принимающие участие в онкогенезе, потенциально могут выступать мишенью при терапии злокачественных новообразований. Во-вторых, высокие темпы клеточной пролиферации, предположительно, делают опухолевые клетки сильно зависимыми от функциональной сплайсосомы, что создаёт потенциальную гиперчувствительность к общей модуляции сплайсинга. Исследование роли альтернативного сплайсинга в онкогенезе и поиск терапевтических мишеней способствовало не только развитию более перспективного направления в онкологии, но и поиску новых лекарственных средств, оказывающих целенаправленное действие на процессы развития злокачественных новообразований.

Ключевые слова: альтернативный сплайсинг, факторы сплайсинга, онкогенез

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Куделина О.М., Сафроненко А.В., Бураева М.Х.-Б., Бураева М.Х.-Б., Величко С.А., Терехова Д.А., Бендерский Н.С., Толстой А.А. Роль альтернативного сплайсинга в онкогенезе. *Биомедицина*. 2024;20(3):130–135. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-3-130-135>

Поступила 09.04.2024

Принята после доработки 17.04.2024

Опубликована 10.09.2024

ROLE OF ALTERNATIVE SPLICING IN ONCOGENESIS

Oksana M. Kudelina^{1,*}, Andrey V. Safronenko¹, Maret Kh.-B. Buraeva¹,
Malika Kh-B. Buraeva², Sofia A. Velichko¹, Diana A. Terekhova¹,
Nikita S. Benderskii², Artem A. Tolstoy¹

¹ Rostov State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia
344022, Russian Federation, Rostov-on-Don, Nakhichevsky Lane, 29

² National Medical Research Centre for Oncology of the Ministry of Health Care of Russia
344037, Russian Federation, Rostov-on-Don, 14th Liniya Str., 63

Over the past two decades, much evidence has accumulated that confirms the crucial role of alternative splicing in the process of tumorigenesis. A more detailed study of splicing mechanisms revealed that targeting the central process for atypical cells could be a potential new approach in the treatment of malignant neoplasms. Firstly, specific protein isoforms that are formed as a result of alternative splicing and are involved in tumorigenesis can potentially act as a target for the treatment of malignant neoplasms. Second,

high rates of cell proliferation presumably make tumor cells highly dependent on a functional spliceosome, creating potential hypersensitivity to global splicing modulation. The study of the role of alternative splicing in tumorigenesis and the search for therapeutic targets contributed not only to the development of a more promising direction in oncology, but also to the search for new drugs that have a targeted effect on the development of malignant neoplasms.

Keywords: alternative splicing, splicing factors, tumorigenesis

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

For citation: Kudelina O.M., Safronenko A.V., Buraeva M.Kh.-B., Buraeva M.Kh.-B., Velichko S.A., Terekhova D.A., Benderskii N.S., Tolstoy A.A. Role of Alternative Splicing in Oncogenesis. *Journal Biomed.* 2024;20(3):130–135. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-3-130-135>

Submitted 09.04.2024

Revised 17.04.2024

Published 10.09.2024

Основные элементы альтернативного сплайсинга

Альтернативный сплайсинг (АС) — один из наиболее важных механизмов генной регуляции, позволяющий получить несколько различных вариантов транскрипта из одного гена. Этот процесс осуществляется с помощью комплекса белков (U2, U4, U5 и U6) и малых ядерных РНК (snRNA), называемого сплайсосомой, который удаляет экзоны и соединяет интроны для формирования зрелой мРНК [6].

Цис-действующие элементы — короткие нуклеотидные последовательности, расположенные как в экзонах, так и в интронах, представляют собой сайты связывания трансдействующих элементов. В зависимости от их положения и функций они подразделяются на энхансеры сплайсинга или сайленсеры. Энхансеры распознаются трансдействующими факторами, принадлежащими к семейству белков, богатых серином/аргинином (SR), что облегчает распознавание сайта сплайсинга и включение экзона. В свою очередь, сайленсеры взаимодействуют с другими типами трансдействующих факторов, такими как гетерогенные рибонуклеопротеины (hnRNPs), чтобы ингибировать распознавание сайта сплайсинга и способствовать пропуску экзона [6].

Другие регуляторы, которые играют ключевую роль в АС, — факторы сплайсинга (ФС) трансдействующие элементы. Они могут быть разделены на две основные категории: положительные и отрицательные регуляторы. Положительные ФС, такие как SR-белки, облегчают связывание компонентов сплайсосомы с прекурсорной РНК и активируют процесс сплайсинга. Отрицательные регуляторы, hnRNP белки, могут блокировать или замедлять связывание компонентов сплайсосомы с экзонами и тем самым предотвращать АС [6].

Таким образом, АС участвует в регуляции процессов пролиферации, дифференцировки и апоптоза клетки посредством регулирования альтернативной экспрессии многих онкогенов или опухолевых генов-супрессоров.

Мутации цис-элементов

АС часто связан с изменениями в цис-регуляторных элементах, которые генерируют новые сайты сплайсинга, о чём свидетельствует открытие R.G. Jayasinghe и соавт. В данном исследовании был проведён анализ данных «Атласа ракового генома» с использованием биоинформационного инструмента MiSplice, который позволил оценить мутации в контексте сплайсинга с использованием данных секвенирования РНК. Было проанализировано

более 8000 образцов опухолей 33 видов рака и выявлено около 2000 мутаций, где отмечались данные изменения. Такой патологический АС в основном затрагивает гены-супрессоры опухолей, такие как *TP53* (многие типы рака), *GATA3* (рак молочной железы) и *PTEN* (глиома) [7].

Несмотря на высокую встречаемость этих мутаций, они вызывают сдвиг рамки считывания в последовательности пре-мРНК и тем самым способствуют образованию кодонов преждевременной терминации, которые, в свою очередь, приводят к удалению неверного транскрипта посредством нонсенс-опосредованного распада мРНК (NMD). Поэтому нарушения в цис-регуляторных элементах в здоровых тканях в основном успешно устраняются, в то время как в опухолях они способствуют метастиазированию и формированию резистентности к терапии [2].

Тем не менее любые мутации в цис-регуляторных элементах, которые приводят к неправильному распознаванию экзонов и интронов в информационной РНК, способствуют образованию aberrантного транскрипта мутированного гена. Обычно цис-мутации, не подвергшиеся NMD, приводят к пропуску всего экзона или его фрагмента во время сплайсинга пре-мРНК. Так, мутация и делеция сайта сплайсинга в гене *MET* (протоонкоген, кодирует тирозинкиназу, отвечающую за связывание с фактором роста гепатоцитов, тем самым активируя сигнальные пути пролиферации клеток) индуцирует пропуск экзона, выступая в роли фактора онкогенеза при аденокарциноме легких (немелкоклеточный рак лёгкого) [1].

Мутации факторов сплайсинга

Ген *SF3B1* занимает ведущее место среди ФС, подвергаясь частым мутациям, является компонентом комплекса U2 snRNP и частью сплайсосомы. Изменения, которые в нём происходят, определяют отдельную клиническую форму миелодиспластического синдрома (МДС) — МДС с кольцевыми

сидеробластами высокого риска, острый миелолейкоз (ОМЛ), а также входит в число часто мутирующих генов при хроническом лимфоцитарном лейкозе и увеальной меланоме [5]. Данный ген (*SF3B1*) влияет на клетки с помощью различных механизмов: во-первых, вызывает включение ядовитого экзона (экзона, который содержит кодон преждевременной терминации в рамке считывания) в ген *BRD9* в разных типах опухолей, оказывая протуморогенный эффект; во-вторых, индуцирует неправильный сплайсинг киназы MAP3K7; в-третьих, нарушает эритропоэз и сплайсинг генов, а именно ген *ABCB7*, который влияет на биосинтез гема и вызывает образование кольцевых сидеробластов [8].

Мутации, затрагивающие SR-белок SRSF2, наблюдаются у 10% всех пациентов с МДС, в т. ч. у 31–47% с хроническим миеломоноцитарным лейкозом (ХММЛ) и у 11% с ОМЛ, реже — при солидных опухолях. Мутации SRSF2 связаны с плохими клиническими исходами при МДС и ускорением прогрессирования до ОМЛ. Изменяется эффективность включения экзона опосредованно SRSF2 из-за нарушения взаимодействия сайтов сплайсинга с U1 и U2 snRNP, всё это приводит к дефектному сплайсингу. Повышенное включение ядовитого экзона в свою очередь приводит к подавлению гистоновой метилтрансферазы (EZH2), участвующей в патогенезе МДС. Примечательно, что мутации с потерей функции EZH2 и мутация SRSF2 при ХММЛ являются взаимноисключающими [4].

U2AF1 — ген фактора, входящего в состав сплайсосомы, мутирует в 5–15% случаев МДС, в 5–17% — ХММЛ и в 3% — аденокарцином лёгких. Мутации в двух активных точках гена вызывают различные изменения в аффинности связывания РНК, что приводит к образованию различных паттернов сплайсинга. Способы, с помощью которых мутации *U2AF1* вызывают заболевание, в настоящий момент до конца не изучены [3].

Изменение экспрессии факторов сплайсинга

Аномальная экспрессия ФС часто происходит в солидных опухолях, приводя к прогрессированию заболевания, даже при отсутствии мутаций в сплайсинговом аппарате. Типичным примером протуморогенного изменения экспрессии является SR-белок SRSF1 в опухолях молочной железы, лёгких, толстой кишки и мочевого пузыря. Это может возникать в опухоли с амплификациями гена, кодирующего транскрипционный фактор (*MYC*). Сверхэкспрессия SRSF1 усиливает AC изоформ белков, обладающих антиапоптотическим эффектом (например, BIN1, BCL2L11, MCL1, CASC4) или увеличивающих пролиферацию раковых клеток (например, RON, MKNK2, S6K1, CASC4, PRRC2C), а также повышающих устойчивость к повреждению ДНК (egPTPMT1 и DBF4B). Кроме того, SRSF1 может активировать передачу сигналов роста на протеинкиназу mTORC1. Таким образом, SRSF1 может действовать синергично с *MYC*, приводя к более высокой степени злокачественности опухоли и более короткой выживаемости у пациентов с раком молочной железы и лёгких, отчасти за счёт усиления активации регулятора трансляции сигнальных путей клеточного роста [3].

Также установлено, что ген *MYC*, регулирующий факторы транскрипции, участвует в патогенезе различных видов рака и контролирует экспрессию многих ФС. В т. ч. регулирует экспрессию семейства hnRNP, которые могут действовать как опухолестимулирующе, так и наоборот. Таким

образом, мутация гена *MYC* способствует онкогенной трансформации, приводя к возникновению лимфомы, глиомы и нейробластомы. Повышение регуляции некоторых специфических hnRNP (hnRNP A1, hnRNP A2 и PTB) участвует в регуляции сплайсинга пируваткиназы и способствует экспрессии, ассоциированной с раком изоформы этого фермента [3]. Изменения, которые происходят в результате нарушения экспрессии ФС, определение их уровня и модуляция их содержания может стать перспективным направлением для поиска абсолютно новых подходов в лечении онкологических заболеваний.

Закключение

Альтернативный сплайсинг играет важнейшую роль для стабильности процессов пролиферации и апоптоза, поэтому изменения экспрессии, мутации его главных составляющих, таких как цис-элементы и факторы сплайсинга, влияют на нормальный цикл клеток. Кроме того, нарушения данного процесса могут приводить к парадоксальному изменению функций белков, участвующих в делении, и оказывать противоположный протуморогенный эффект. Учитывая всё сказанное о влиянии альтернативного сплайсинга на онкогенез, можно сделать вывод, что данный регуляторный механизм представляет определённый интерес для проведения фундаментальных доклинических, а в последующем — клинических исследований, результаты которых могут стать основой для прорыва в терапии и диагностике онкозаболеваний.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Abramowicz A., Gos M. Splicing mutations in human genetic disorders: examples, detection, and confirmation. *J. Appl. Genet.* 2018;59(3):253–268. DOI: 10.1007/s13353-018-0444-7
2. Bessa C., Matos P., Jordan P., Gonçalves V. Alternative splicing: Expanding the landscape of cancer biomarkers and therapeutics. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(23):9032. DOI: 10.3390/ijms21239032
3. Bradley R.K., Anczuków O. RNA splicing dysregulation and the hallmarks of cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 2023;23(3):135–155. DOI: 10.1038/s41568-022-00541-7
4. Chen S., Benbarche S., Abdel-Wahab O. Splicing factor mutations in hematologic malignancies. *Blood.* 2021;138(8):599–612. DOI: 10.1182/blood.2019004260

5. Dalton W.B., Helmenstine E., Pieterse L., Li B., Gocke C.D., Donaldson J., Xiao Z., Gondek L.P., Ghiaur G., Gojo I., Smith B.D., Levis M.J., DeZern A.E. The K666N mutation in SF3B1 is associated with increased progression of MDS and distinct RNA splicing. *Blood Adv.* 2020;4(7):1192–1196. DOI: 10.1182/bloodadvances.2019001127
6. Ghigna C., Paronetto M.P. Alternative splicing: Recent insights into mechanisms and functional roles. *Cells.* 2020;9(10):2327. DOI: 10.3390/cells9102327
7. Jayasinghe R.G., Cao S., Gao Q., Wendl M.C., Vo N.S., Reynolds S.M., Zhao Y., Climente-González H., Chai S., Wang F., Varghese R., Huang M., Liang W.W., Wyczalkowski M.A., Sengupta S., Li Z., Payne S.H., Fenyó D., Miner J.H., Walter M.J.; Cancer Genome Atlas Research Network; Vincent B., Eyras E., Chen K., Shmulevich I., Chen F., Ding L. Systematic analysis of splice-site-creating mutations in cancer. *Cell Rep.* 2018;23(1):270–281.e3. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.03.052
8. Jiang M., Chen M., Liu Q., Jin Z., Yang X., Zhang W. SF3B1 mutations in myelodysplastic syndromes: A potential therapeutic target for modulating the entire disease process. *Front. Oncol.* 2023;13:1116438. DOI: 10.3389/fonc.2023.1116438

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

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

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

Буряева Марет Хаваж-Баудиевна, ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России;
e-mail: meriberskaa@gmail.com

Maret Kh.-B. Burayeva, Rostov State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: meriberskaa@gmail.com

Буряева Малика Хаваж-Баудиевна, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России;
e-mail: malika_buraeva@mail.ru

Malika Kh.-B. Burayeva, National Medical Research Centre for Oncology of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: malika_buraeva@mail.ru

Величко Софья Алексеевна, ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России;
e-mail: vel-sofa@mail.ru

Sofia A. Velichko, Rostov State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: vel-sofa@mail.ru

Терехова Диана Андреевна, ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России;
e-mail: danat88022@gmail.com

Diana A. Terekhova, Rostov State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: danat88022@gmail.com

Бендерский Никита Сергеевич, ФГБУ
«Национальный медицинский исследователь-
ский 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

Толстой Артём Александрович, ФГБОУ ВО
«Ростовский государственный медицинский
университет» Минздрава России;
e-mail: ar.tolstoj@yandex.ru

Artem A. Tolstoy, Rostov State Medical University
of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: ar.tolstoj@yandex.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

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

Приоритетные области и задачи научных исследований:

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

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

Предпочтение при публикации в журнале имеют научные труды, выполненные по группам специальностей *биологические науки (физиология человека и животных, биотехнология, клеточная биология), медико-биологические науки (фармакология, авиационная, космическая и морская медицина), клиническая медицина (восстановительная медицина, спортивная медицина, лечебная физкультура, курортология и физиотерапия)*.

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

Учредитель научного журнала «Биомедицина» – ФГБУН «НЦБМТ ФМБА России» обеспечивает проверку представляемых к опубликованию рукописей на наличие неправомерных заимствований путем получения от авторов и организаций, направляющих рукопись научной работы в редакцию, информации в сопроводительных документах о нижеследующем:

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

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

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

За публикацию статей плата не взимается и гонорар не выплачивается.

После опубликования статьи авторам высылаются бесплатно один экземпляр журнала.

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

Лабораторкорм

Более десяти лет коллектив нашей организации обеспечивает высококачественным комбикормом для лабораторных животных научные медицинские и учебные учреждения России.

Реализуем:

- ✓ Оборудование для вивариев (клетки-стеллажи и др.);
- ✓ Подстилочный материал из древесной стружки;
- ✓ Зерно: пшеница, овес, ячмень,
- ✓ Премиксы.

НАШИ КОРМА
полнорационные,
сбалансированные по
аминокислотному составу,
минералам и витаминам



Доставка в любой регион России

Наш адрес: Москва, 2-й Вязовский проезд, д. 16, стр. 10

ООО «Лабораторкорм»

Телефоны: (495) 972-99-72, 972-16-87, 220-01-23

www.laboratorkorm.ru

Филиал «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России

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

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

Филиал «Столбовая» предлагает следующих животных:

I. Инбредные мыши линий:

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

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

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

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

II. Трансгенные мыши линий:

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

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

III. Межлинейные гибриды мышей:

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

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

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

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

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

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

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



142350, Московская обл., Чеховский р-н, п. Столбовая, ул. Мира, д. 1а
Тел.: 8(495)996-59-52; 8(496)726-95-15
Закупка животных: 8(964)768-25-40; 8(916)021-02-50; 8(916)021-00-76
E-mail: biomaus@mail.ru